



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle et implication dans la maladie d'Alzheimer d'une nouvelle forme tronquée de la protéine Tau

Coline Leghay

► **To cite this version:**

Coline Leghay. Caractérisation fonctionnelle et implication dans la maladie d'Alzheimer d'une nouvelle forme tronquée de la protéine Tau. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S060 . tel-03857557

HAL Id: tel-03857557

<https://theses.hal.science/tel-03857557>

Submitted on 17 Nov 2022

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 II

Ecole doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Spécialité : Neurosciences

Présentée par :

Coline Leghay

**Caractérisation fonctionnelle et implication dans la maladie
d'Alzheimer d'une nouvelle forme tronquée de la protéine Tau**

Soutenue publiquement le 19 septembre 2017 devant le jury composé de :

Mr le Pr. Jean-Pierre BRION	Rapporteur
Mme le Dr Marie-Laure PARMENTIER	Rapporteur
Mme le Dr Marie-Hélène DAVID-CORDONNIER	Examineur
Mr le Dr Guillaume DOROTHEE	Examineur
Mr le Dr. Luc BUEE	Président du jury
Mme le Dr Malika HAMDANE	Directrice de Thèse

« Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »

Léonard de Vinci – Architecte, Artiste, Ingénieur, Peintre, Philosophe, Scientifique, Sculpteur
(1452-1519)

A mes parents,

A ma sœur,

A Lucky.

Remerciements

Pour débiter, je remercie les membres de mon jury, le Pr. **Jean-Pierre BRION**, le Dr. **Marie-Laure PARMENTIER**, le Dr. **Marie-Hélène DAVID-CORDONNIER**, le Dr. **Guillaume DOROTHEE**, le Dr. **Malika HAMDANE** et le Dr. **BUEE Luc** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury de thèse et d'examiner ce travail. Je remercie tout particulièrement le Pr. **Jean-Pierre BRION** et le Dr. **Marie-Laure PARMENTIER** pour avoir accepté de prendre en charge le rôle de rapporteur.

Je tiens à remercier le Dr. **Luc BUEE** de m'avoir accueilli au sein du centre de recherche Jean-Pierre Aubert et plus particulièrement dans son équipe « Alzheimer & Tauopathies » durant mes stages de Master et pour la thèse. Merci pour le temps que vous m'avez accordé, vos précieux conseils scientifiques et professionnels ainsi que votre bienveillance. Je n'oublierais pas non plus, les repas de Noël et les problèmes de balance !

La suite de ces remerciements s'adresse à ma directrice de thèse ; le Dr. **Malika HAMDANE**. Tout d'abord, merci pour m'avoir donné l'opportunité de débiter sur le projet des formes tronquées de Tau dès mon année de Master1. J'ai beaucoup appris à vos côtés, que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain. Vous avez toujours su me guider, m'apporter votre soutien et la motivation tout au long de la thèse. J'en profite pour vous remercier de m'avoir permis de participer au congrès « *Society for Neurosciences* », une expérience hors du commun et très enrichissante. De plus, vous m'avez également permis de goûter à l'enseignement en acceptant que je réalise du monitorat et en me donnant la possibilité d'encadrer des étudiants. Toutes ces opportunités m'ont permis de me faire une idée sur mon projet professionnel à venir. Je vous souhaite une bonne continuation au sein de l'équipe et hors cadre professionnel. Encore merci !

Merci au Dr. **Valérie BUEE-SCHERRER** pour m'avoir fait découvrir la vie de laboratoire lors de mon stage de Licence et pour l'aide dans la dissection des tissus cérébraux humains.

Merci aux Dr. **Vincent DERAMECOURT**, **Susanna SCHRAEN** et Pr. **Claude-Alain MAURAGE** pour l'aide dans l'obtention des échantillons humains.

Merci aux Docteurs **Morvane COLIN**, **Sophie HALLIEZ**, **David BLUM**, **Nicolas SERGEANT**, **Valérie VINGTDEUX**, **Bernard SABLONNIERE**, **Claire-Marie DHAENENS**, **Bruno LEFEVBRE** et **Marie-Christine GALAS** pour leurs remarques pertinentes et leurs conseils durant les répétitions de Master2 et les réunions

de « labo ». Un merci particulier à Bruno pour les discussions dans le L2 culture cellulaire et les petits « pics » à prendre toujours sur le ton de la rigolade.

Merci également aux personnes qui gèrent notre quotidien, et nous simplifie de nombreuses tâches administratives, je pense notamment à **Céline BRAND**, **Nathalie PERRAIS**, **Michèle REVEZ**, **Staëlle CORVO-CHAMAILLARD** et « ma petite » **Sophie LESAGE** (ta danse avec Francisco restera gravée dans ma mémoire). Un grand merci à Thomas du service laverie, qui ramène la bonne humeur dans le grand labo par ces petites blagues et ses sifflements ! En plus de cette bonne humeur, il faut admettre que le labo tourne beaucoup moins bien quand tu es absent. Merci à **Laëtitia** et **Charlotte** pour leur travail de titan concernant l'organisation des évènements scientifiques et grands publics auxquels nous sommes conviés.

Un merci particulier au Dr **Maxime DERISBOURG** (Max pour les intimes), qui a initié le projet « troncation de Tau ». Premièrement, travailler à tes côtés a été un réel plaisir ; aussi bien pour l'apprentissage des expériences que pour les points scientifiques. Deuxièmement, tes blagues, tes expériences à la « MacGyver » (et si on mettait de la javel dans l'ECL, les eppendorfs-carboglace et j'en passe...), ton absence de style artistique pour la coiffure mais tes chemises pour passer des oraux... tout ça resteront des moments à la Max ! Ton départ a fait un vide dans le labo (surtout pour moi, je l'avoue) mais tu as préféré aller t'éclater avec les vers (☺). Trêve de plaisanterie, je te souhaite plein de réussite !

Une mention spéciale pour ma **Domi**, je te considère comme ma « maman du labo ». Malgré notre différence d'âge (qui n'est que dans la tête, car je souhaiterais être aussi belle et jeune que toi à ton âge) nous avons tout suite été sur la même longueur d'onde aussi bien pour les manips que pour les pauses afin de regarder la dernière collection Longchamp. Ta rencontre restera marquée dans mon cœur, tu es une personne géniale avec un grand cœur. Profite-bien de ta nouvelle maison, une retraite bien méritée aux côtés de J-M.

Je remercie aussi nos anciens, **Francisco** (fan inconditionnel de Céline), **Hélène** (j'oublie pas les matinales avec toi et le Mr du ménage), **Cyril** (toujours en train de manger et faire du sport ☺), **Simon** (ça y est en plus du grade de Dr, tu as obtenu le grade de papa Simon), **Meliza** (avec son tique de toujours se regarder dans le miroir de son iPhone et ses supers contacts aaaAAATaf), **Charlotte** (alias blondie). Je n'oublie pas non plus les anciens du bureau du fond, le duo incontournable **Banban** et **Toto** (les doctoriales, aller chercher les commandes). **Banban**, ton sens de l'organisation et ton côté très zen m'ont toujours impressionnée ! Je n'oublierais jamais tes découvertes musicales (« Michel Forever tonight », « l'enfant handicapé », « et si c'était un AVC », « pirouette cacahuète ») qui reste des heures en tête. En tout cas, tu es un bosseur et tu mérites de réussir au Canada (je croise les doigts pour toi et Meumeu).

Toto, (ou devrais-je dire Mr Blot) après avoir été voisin dos à dos (et avec quelques querelles concernant des histoires de températures), on est passé côte à côte dans le fameux « bureau du fond ». Vive les clones cellulaires stables et la chanson de Sébastien Patoche, n'est ce pas ? On s'est soutenu mutuellement dans des moments pas trop faciles, mais aujourd'hui tu es parti t'exiler chez les « mangeurs de frites ». Pleins de bonnes choses pour ton avenir professionnel (et perso aussi avec ma Caro). Ce bureau a également été rejoint par **Mathou**, avec qui nous avons partagé de nombreux moments. Les pauses du midi étaient plus que sympathiques à tes côtés, sans oublier les bons plans Showroom ! Même si tu devais au départ partager ton bureau avec Alex, la co-habitation s'est bien déroulée. **Alex**, je me souviens de ton fameux costume mais tu m'as déçue lors de ton arrivée au labo (un simple polo), ça y est un ingénieur avait rejoint le groupe ! Ton intégration s'est faite naturellement, même si j'avoue que tu étais plus du côté des garçons que du mien ! Le bureau du fond s'est renouvelé, et j'avoue que la rédaction de la thèse n'a pas dû être facile à vivre. **Théo** (alias Mr Prof), **Marie** (3 étoiles minimum), **Mélissa** (que c'est crevant de voir crever une crevette... je t'interroge d'ici la fin de l'année), je garde en tête la musique des « MiniKeums » mais aussi « Mélissa, métisse d'Ibissa » et **Thomas** (tranches et MEA power). Mention spécial pour **Meggie**, et son acolyte Rico Chicco (Muy bonita seniorita Hey !), on ne se connaît pas depuis des lustres mais notre rencontre est plus que belle. Passons aux expatriés, **Sarah** et son Nanosight associés à ses CHIPS (gros cliché), sans oublier les petits bruits d'imitation que l'on essaye encore d'imiter à la perfection avec Meggie. Vive le « Blonde Power » et n'oublions pas Marcos et sa guitare. **Caro**, la sportive tatouée et « geek » du labo ; **Alane**, des débuts sur les ELISA pour apprendre à se connaître (☺) ; **Kévin** et ses supers GIF ; **Clément** et ses camélidés (sans oublier la petite voix mielleuse, « ben pourquoi ? »). **Claire**, et ton entrée dans le bureau (« Albannnnnn ! j'ai une question » et le fameux « en vous remerciant ! ») me restera en mémoire, des bisous à Beubeu. **Emilie** c'était un plaisir de partir avec toi en congrès (fait-nous un beau bébé trop chou). Je n'oublie pas non plus **Espérance**, **Meryem**, **Aude**, **Céline**, **Victoria**, **Anna**, **Marie-Line**, **Catherine**, **Manon** et **Claudia**.

Un grand merci à **Sébastien**, **Séverine**, **Sabiha** et **Raph** pour votre aide technique et votre disponibilité. Nous avons la chance de vous avoir dans l'équipe. **Sabiha**, on a passé beaucoup de temps ensemble sur les ELISA avec des moments de stress pour des puits qui devaient virer au bleu (le bleu n'est pas encore devenu ma couleur préféré !). **Séverine**, avec Mila née le même jour que moi tu n'as jamais oublié mon anniversaire (☺), un casse tête sur le clonage que tu as résolu !! **Raph**, l'immunohisto nous a bien rapprochée, vive les 10000 conditions sur le Crésyl, l'observation au microscope avec la DAB je m'en rappellerai lorsque l'on a vu le 1^{er} marquage du 2H2/D11 !!

Sarah G., le « flambeau » te revient. Encore félicitations pour le M2R et la réussite au concours pour la bourse de thèse !!! ça a été un plaisir de travailler avec toi. Je compte sur toi pour mettre à sec les microlitres du 2H2/D11 (☺). Plein de réussite dans cette aventure.

Florian, derrière ton calme se cache un vrai piégeur de souris ! Un grand merci pour ton aide et je pense que je peux te décerner le rang de meilleur doseur ELISA. Bonne continuation à toi dans ton projet professionnel.

En addition de ce cadre professionnel, je remercie celles et ceux qui me sont chers, notamment mes amis et ma famille. **Papa, Maman**, merci pour m'avoir toujours soutenu et pour m'avoir donné un confort de vie plus que sublime pour ces études. **Maureen**, merci d'être la petite sœur au grand cœur (vive le shopping !). **Julien**, merci pour ton soutien et ta patience, le chemin était long mais ça y est je suis au bout ! **Romu**, merci pour ton soutien dans ces derniers moments de la thèse, me supporter n'était pas une mince affaire ! Sans oublier une petite léchouille à mon pirate, **Lucky** qui a été au cœur de cette rédaction.

Pour terminer, je souhaite remercier les organismes financeurs de ma thèse : le CHU de Lille et la région Hauts-de-France.

Résumé

La protéine Tau, pour *Tubulin Associated Unit*, est majoritairement exprimée au sein de la population neuronale. Elle appartient à la famille des protéines associées aux microtubules. Sa fonction majoritaire est de permettre la régulation de la dynamique microtubulaire afin d'assurer la modulation de nombreux mécanismes neuronaux tels que le transport axonal ou les connexions synaptiques. D'autres fonctions de Tau ont vu le jour depuis ces dernières années notamment au niveau de la signalisation cellulaire et la protection de l'ADN. A côté de ces fonctions physiologiques, la protéine Tau joue un rôle central dans un groupe de pathologies neurodégénératives regroupées sous le terme de Tauopathies. Dans ces pathologies, Tau est retrouvée sous forme agrégée et anormalement modifiée dans les neurones en dégénérescence. Dans la maladie d'Alzheimer, Tauopathie la plus fréquente, l'agrégation de Tau conduit à l'apparition d'une lésion histopathologique dénommée dégénérescence neurofibrillaire (DNF). Cette lésion montre une évolution spatiotemporelle qui est corrélée aux signes cliniques.

Aujourd'hui, tous les mécanismes conduisant à l'agrégation de Tau et à la formation de la DNF ne sont pas clairement expliqués mais il apparaît clairement qu'une dérégulation des modifications post-traductionnelles est un élément conduisant à la pathologie Tau. En effet, de nombreux travaux ont montré la présence de formes tronquées dans la partie amino- et carboxy-terminale de Tau au sein de tissu cérébral provenant de patients Alzheimer. A ce jour, l'identité et le rôle de toutes les formes tronquées de Tau ne sont pas connus. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse, il se concentre sur l'étude d'une nouvelle forme tronquée de Tau débutant à la Methionine11 (forme tronquée Met11-Tau). Cette forme tronquée a également été détectée avec une modification post-traductionnelle encore jamais décrite pour Tau, la N- α -acétylation (forme tronquée AcMet11-Tau).

Afin d'étudier la forme tronquée AcMet11-Tau, le développement d'un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre cette espèce de Tau a été réalisé au cours de ce travail de thèse. Cet outil immunologique obtenu a permis de montrer que la forme tronquée AcMet11-Tau est retrouvée précocement au sein du tissu cérébral d'un modèle de souris transgénique (Thy-Tau22) et au sein du tissu cérébral provenant de patients Alzheimer. Ainsi, ces résultats suggèrent fortement que la forme tronquée AcMet11-Tau est une espèce pathologique de Tau. En plus de ces études sur tissu cérébral, un modèle cellulaire de neuroblastome humain stable et inductible pour la protéine Tau entière et la forme tronquée Met11-Tau a été généré, en vue de déterminer le rôle de la N- α -acétylation sur Tau. Les études préliminaires ont montré que l'AcMet11-Tau ne présentait pas la même demi-vie que la protéine Tau entière. De plus, des outils de modulation du niveau de N- α -acétylation ont été validés.

Ainsi, sur la base de ces résultats originaux et très prometteurs quant à l'association de la protéine AcMet11-Tau à la pathologie Tau et des outils générés, ce travail ouvre des perspectives pour réaliser des études *in vivo*, en vue de préciser le rôle de AcMet11-Tau dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer. De plus, des études complémentaires sur le mécanisme de génération de

cette espèce de Tau permettrait de mieux comprendre et contrecarrer la synthèse de celle-ci.

Abstract

The Tau protein, for Tubulin Associated Unit is predominantly expressed within the neuronal population. It belongs to the family of microtubule associated proteins. Its main function is to allow the régulation of microtubule dynamic in order to ensure the modulation of numerous neuronal mechanisms such as axonal transport or synaptic connections. Other functions of Tau have been described since the last years especially in the level of cell signaling and DNA protection. In addition of these physiological functions, Tau protein plays a central role in a set of neurodegenerative diseases called Tauopathies. In these pathologies, Tau is found in aggregated form and abnormally modified in degenerating neurons. In Alzheimer's disease, the most common Tauopathie, the aggregation of Tau leads to the appearance of a histopathological lesion called neurofibrillary degeneration (NFD). This lesion shows a spatiotemporal evolution that is correlated with clinical signs.

Today, all mechanisms leading to Tau aggregation and NFD formation are not clearly explained, but it is clear that deregulation of post-translational modifications is an element leading to Tau pathology. Indeed, many studies have shown the presence of truncated forms in the amino- and carboxyl-terminal part of Tau within cerebral tissue from Alzheimer's patients. To date, the identity and the role of all truncated Tau species are not very known. It is in this context that this thesis project falls, focusing on the study of a new truncated Tau beginning at Methionine11 (Met11-Tau truncated form). This truncated Tau form was also detected with a post-translational modification not previously described for Tau, N- α -acetylation (AcMet11-Tau truncated form).

In order to study the truncated form AcMet11-Tau, the development of a monoclonal antibody targeted specifically this Tau species was realized during this thesis work. This immunological tool has shown that the AcMet11-Tau truncated form was found early in the cerebral tissue of a transgenic mouse model (Thy-Tau22) and in brain tissue from Alzheimer's. Thus, these results strongly suggest that the AcMet11-Tau truncated form is a pathological species of Tau. In addition to these brain tissue studies, a stable and inducible human neuroblastoma cell model for the full length Tau and the Met11-Tau were generated to determine the role of N- α -acetylation on Tau. Preliminary studies have shown that AcMet11-Tau do not display the same half-life than the full-length Tau. In addition, tools for modulating the N- α -acetylation level have been validated.

Thus, on the basis of these original and very promising results for the association of the AcMet11-Tau protein with the Tau pathology and generated tools, this work opens up prospects for *in vivo* studies in order to clarify the role of AcMet11-Tau in the physiopathological process of Alzheimer's disease. Moreover, further studies are needed concerning the mechanism generation of this species to a better understanding and to counteracting the synthesis of AcMet11-Tau.

Sommaire

<i>Liste des figures</i>	6
<i>Liste des tableaux</i>	9
<i>Liste des abréviations</i>	10
 <i>Introduction</i>	 12
 Chapitre 1 : Physiologie et Pathologie de la protéine Tau	 13
A. La Physiologie de la protéine Tau	13
<i>A.1. Du gène vers les protéines Tau</i>	13
<i>A.2. Structure de la protéine Tau</i>	15
<i>A.3. Fonctions de la protéine Tau</i>	17
A.3.a. Régulation de la dynamique microtubulaire.....	18
A.3.a.1. Les microtubules : constituant du cytosquelette.....	18
A.3.a.2. Interaction des microtubules avec les protéines associées aux microtubules (MAP)	19
A.3.b. Régulation du transport axonal	20
A.3.c. Régulation de la neurogenèse et de la croissance neuritique	22
A.3.d. Régulation de la plasticité synaptique et de la signalisation cellulaire	23
A.3.e. Protection de l'ADN.....	24
B. La physiopathologie de la protéine Tau	25
<i>B.1. Les Tauopathies</i>	25
B.1.a. Classification des Tauopathies	26
B.1.b. La maladie d'Alzheimer : Tauopathie majoritaire	28
B.1.b.1. Généralités	28
B.1.b.2. Facteurs de risques	28
B.1.b.2.a Facteurs environnementaux.....	28
B.1.b.2.b Facteurs de risques génétiques	29
B.1.b.3. Aspects cliniques.....	30
B.1.b.4. Diagnostic	30
B.1.b.5. Les lésions neuropathologiques	31
B.1.b.5.a. Aspects macroscopiques	31
B.1.b.5.b. Aspects microscopiques.....	32
B.1.b.5.a.1. Les plaques amyloïdes.....	32
B.1.b.5.a.2. Les dégénérescences neurofibrillaires	34
B.1.b.6. Relation entre les deux lésions neuropathologiques	36
B.1.b.7. Traitements et stratégies thérapeutiques en cours.....	37
 Chapitre 2 : Les modifications post-traductionnelles de la protéine Tau et leur implications physiologiques et pathologiques	 39
A. La phosphorylation de la protéine Tau	39
<i>A.1. Les kinases et phosphatases agissant sur la protéine Tau</i>	40
<i>A.2. La phosphorylation, régulatrice des fonctions de Tau</i>	40
<i>A.3. La phosphorylation de Tau dérégulée dans la maladie d'Alzheimer</i>	42

B. Les autres modifications post-traductionnelles de Tau : aperçu général	45
<i>B.1. La O-N-Acetylglucosaminylation (O-GlcNAc)</i>	<i>45</i>
<i>B.2. La nitration</i>	<i>45</i>
<i>B.3. L'acétylation</i>	<i>46</i>
<i>B.4. L'ubiquitinylation.....</i>	<i>46</i>
C. La troncation, une modification post-traductionnelle récemment étudiée.....	47
<i>C.1. Définition générale de la troncation.....</i>	<i>47</i>
<i>C.2. La troncation de la protéine Tau, lien avec les Tauopathies.....</i>	<i>48</i>
C.2.a. Les formes tronquées de Tau dans la partie carboxy-terminale identifiées dans la maladie d'Alzheimer	48
C.2.a.1. Découverte inattendue de la forme tronquée se terminant par le résidu E391	49
C.2.a.2. La forme tronquée se terminant par le résidu D421	51
C.2.a.3. La forme tronquée se terminant par le résidu N358	52
C.2.b. Les formes tronquées de Tau dans la partie amino-terminale retrouvées dans la maladie d'Alzheimer	52
C.2.c. Les formes tronquées de Tau dans les autres Tauopathies.....	53
<i>C.3. Les formes tronquées retrouvées dans le liquide céphalo-rachidien</i>	<i>55</i>
<i>C.4. La troncation : quelles conséquences sur les fonctions de Tau ?</i>	<i>55</i>
C.4.a La troncation de Tau : gain de fonction toxique ?.....	56
C.4.b. Implication de la troncation de Tau dans la formation de la DNF	57
C.4.c. La troncation de Tau dans les domaines carboxy- et amino-terminaux : études dans les modèles animaux et cellulaires	59
<i>C.5. Les potentiels acteurs impliqués dans la troncation de la protéine Tau</i>	<i>61</i>
Chapitre 3 : La N-α-acétylation, une modification jamais décrite pour la protéine Tau	63
A. Découverte et généralités	63
B. Les mécanismes de la N- α -acétylation	64
<i>B.1. La N-α-acétylation</i>	<i>64</i>
<i>B.2. Les N-α-acétyltransférases (Nats)</i>	<i>65</i>
B.2.a. La N- α -acétyltransférase A (NatA)	65
B.2.b. Les autres N- α -acétyltransférases	66
<i>B.3. Les spécificités de substrat des Nats</i>	<i>67</i>
<i>B.4. Rôles physiologiques cellulaires des Nats</i>	<i>68</i>
C. Les fonctions variées de la N- α -acétylation	70
<i>C.1. La N-α-acétylation affecte la stabilité protéique</i>	<i>70</i>
<i>C.2. La N-α-acétylation influence la localisation subcellulaire des protéines</i>	<i>71</i>
<i>C.3. La N-α-acétylation régule les interactions protéiques</i>	<i>72</i>
<i>C.4. La N-α-acétylation affecte la conformation des protéines</i>	<i>72</i>
D. La N- α -acétylation impliquée dans de nombreuses pathologies	73
<i>D.1. Les pathologies humaines causées par des mutations des Nats.....</i>	<i>73</i>

<i>D.2. Implication des Nats dans les cancers</i>	74
<i>D.3. La N-α-acétylation et les Nats dans les maladies neurodégénératives</i>	75
<i>Objectifs de la thèse</i>	77
<i>Matériels & Méthodes</i>	80
A. Matériels.....	81
<i>A.1. Lignée cellulaire</i>	81
<i>A.2. Tissu cérébral murin</i>	81
<i>A.3. Tissu cérébral humain</i>	82
B. Méthodes	84
<i>B.1. Culture cellulaire</i>	84
<i>B.1.a. Entretien des lignées cellulaires</i>	84
<i>B.1.b. Etablissement des lignées cellulaires stables</i>	84
B.1.b.1. Vecteurs plasmidiques d'expression eucaryote	84
B.1.b.2. Construction des vecteurs d'expression inductibles	85
<i>B.1.b.2.a. Les amorces</i>	85
<i>B.1.b.2.b. Clonage des ADNc dans le vecteur pcDNA4/TO</i>	86
B.1.b.3. Transfections stables	87
<i>B.1.c. Transfection transitoire</i>	88
B.1.c.1. Surexpression de la sous-unité catalytique de la Naa20	88
B.1.c.2. si-RNA dirigé contre la sous-unité catalytique Naa20.....	88
<i>B.1.d. Infection lentivirale shRNA dirigé contre la sous-unité catalytique Naa20</i> ...	89
<i>B.1.e. Traitement pharmacologique</i>	89
<i>B.2. Culture primaire</i>	89
B.2.a. Entretien des cultures primaires de neurones corticaux.....	89
B.2.b. Infection lentivirus.....	90
<i>B.3. Génération et caractérisation de l'anticorps monoclonal 2H2/D11</i>	90
B.3.a. Immunisation et obtention des hybridomes	90
B.3.b. Screening des hybridomes par ELISA indirect	91
B.3.c. Immunodéplétion	91
<i>B.4. Analyses biochimiques</i>	92
B.4.a. Extraction des protéines totales.....	92
B.4.b. Electrophorèse monodimensionnelle	92
B.4.c. Western Blot	93
B.4.d. Dosage ELISA	94
<i>B.5. Immunohistochimie en visible sur coupes cérébrales murines et humaines</i>	95
B.5.a. Immunohistochimie sur coupes cérébrales flottantes.....	95
B.5.b. Immunohistochimie sur coupes cérébrales en paraffine.....	96
B.5.c. Analyse des immunohistochimies en visible	97
<i>B.6. Immunofluorescence (expérience de co-marquage)</i>	97

C. Analyses statistiques	98
--------------------------------	----

Résultats	99
------------------------	-----------

Chapitre 1 : Identification d'une nouvelle forme de la protéine Tau tronquée de sa partie amino-terminale et génération d'outils immunologiques.....	100
---	------------

A. Identification de la nouvelle forme de Tau tronquée de sa partie amino-terminale : Met11-Tau.....	101
--	-----

<i>A.1. Approche protéomique développée au sein du laboratoire pour l'identification de nouveaux sites de troncation de Tau</i>	<i>101</i>
---	------------

<i>A.2. Identification de nouveaux sites de troncation de Tau à partir de lignées cellulaires et de tissus cérébraux humains et intérêt pour la forme tronquée Met11-Tau</i>	<i>102</i>
--	------------

B. Développement d'outils appropriés à l'étude de l'AcMet11-Tau	108
---	-----

<i>B.1. Génération et caractérisation de lignées cellulaires stables et inductibles</i>	<i>108</i>
---	------------

<i>B.2. Génération d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine AcMet11-Tau..</i>	<i>110</i>
--	------------

<i>B.2.a. Immunisation animale et contrôle de la réponse immunitaire</i>	<i>111</i>
--	------------

<i>B.2.b. Fusion et obtention des hybridomes.....</i>	<i>112</i>
---	------------

<i>B.2.c. « Screening » et Clonage des hybridomes</i>	<i>113</i>
---	------------

<i>B.2.d. Caractérisation de l'anticorps monoclonal dirigé contre l'AcMet11-Tau</i>	<i>115</i>
---	------------

Chapitre 2 : Pertinence de la forme tronquée AcMet11-Tau par rapport à la pathologie Tau	118
---	------------

A. Analyse du tissu cérébral humain et murin : association potentielle de AcMet11-Tau avec la maladie d'Alzheimer ?	119
---	-----

<i>A.1. Analyse du tissu cérébral humain par Western Blot</i>	<i>119</i>
---	------------

<i>A.2. Analyse du tissu cérébral murin</i>	<i>122</i>
---	------------

<i>A.2.a. Par la méthode d'immunohistochimie</i>	<i>122</i>
--	------------

<i>A.2.b. Par la méthode de dosage ELISA « sandwich »</i>	<i>126</i>
---	------------

<i>A.3. Analyse du tissu cérébral humain</i>	<i>128</i>
--	------------

<i>A.3.a. Par la méthode d'immunohistochimie</i>	<i>128</i>
--	------------

<i>A.3.b. Par la méthode de dosage ELISA « sandwich »</i>	<i>131</i>
---	------------

B. Association de la forme tronquée AcMet11-Tau avec d'autres Tauopathies ?	133
---	-----

Chapitre 3 : Vers la caractérisation fonctionnelle de la forme tronquée Met11-Tau et la détermination du rôle de la N-α-acétylation	139
--	------------

A. Modèle d'étude cellulaire et validation de la forme tronquée AcMet11-Tau.....	140
--	-----

B. Vers l'identification de la Nat responsable de la N- α -acétylation de la forme tronquée AcMet11-Tau	142
<i>B.1. Surexpression de la NatB dans les lignées stables et inductibles.....</i>	142
<i>B.2. Inhibition de la NatB dans les lignées stables et inductibles.....</i>	144
C. Quelles sont les rôles de la N- α -acétylation sur la forme tronquée Met11-Tau par rapport à la protéine Tau entière ?	148

Conclusion-Discussion..... 151

A. La génération d'outils nécessaires à l'étude de la forme tronquée Met11-Tau N- α -acétylée (AcMet11-Tau) et non modifiée	154
B. La caractérisation fonctionnelle de la forme tronquée Met11-Tau et du rôle de la N- α -acétylation.....	155
<i>B.1. Les fonctions du domaine amino-terminal de Tau ne sont pas encore clairement déterminées</i>	155
<i>B.2. Quel est le ou les rôle(s) de la N-α-acétylation sur la protéine Tau ?.....</i>	156
C. Association de la forme tronquée AcMet11-Tau avec la pathologie Tau.....	159
D. Mécanisme Potentiel de génération de la forme tronquée Met11-Tau	163
E. Perspectives de travail dans les modèles animaux : mieux comprendre le comportement de la forme tronquée Met11-Tau et le rôle de la N- α -acétylation	164

Bibliographie..... 166

Liste des figures

Figure 1 : Du gène MAPT aux six isoformes protéiques de Tau.

Figure 2 : La conformation dite en « thrombone » de Tau.

Figure 3 : La structure primaire de Tau.

Figure 4 : Représentation schématique de la dynamique microtubulaire.

Figure 5 : De nombreuses fonctions décrites pour la protéine Tau.

Figure 6 : Le « code barre » des Tauopathies.

Figure 7 : Les différentes inclusions de Tau permettent l'identification des Tauopathies.

Figure 8 : Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer.

Figure 9 : Les cinq stades de développement de la pathologie amyloïde dans la maladie d'Alzheimer.

Figure 10 : Progression de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) dans la maladie d'Alzheimer selon Braak.

Figure 11 : Régulation de la dynamique microtubulaire via la protéine Tau.

Figure 12 : Localisation des sites de phosphorylation de la protéine Tau provenant de cerveau de patients Alzheimer.

Figure 13 : Représentation schématique de la structure des PHFs natifs et digérés à la pronase.

Figure 14 : Les formes tronquées de Tau dans les Tauopathies.

Figure 15 : Les sites de troncation identifiés sur la protéine Tau et leur mode de génération.

Figure 16 : Conséquence de la troncation sur la protéine Tau.

Figure 17 : Représentation schématique de la formation de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF).

Figure 18 : Réaction de N- α -acétylation.

Figure 19 : La famille des N- α -acétyltransférases (Nats).

Figure 20 : Les spécificités de substrats des Nats.

Figure 21 : Les fonctions de la N- α -acétylation sur les protéines.

Figure 22 : Approche protéomique développée au sein du laboratoire pour l'identification des sites de clivage amino-terminaux de Tau.

Figure 23 : Caractérisation par WB de la troncation de la protéine Tau au sein de lignées cellulaires surexprimant Tau.

Figure 24 : Caractérisation par WB de la troncation de Tau au sein du tissu cérébral humain.

Figure 25 : Localisation des sites de troncation nouvellement identifiés à partir du tissu cérébral humain.

Figure 26 : Spectre de masse MS/MS du peptide Met11-Tau et AcMet11-Tau à partir de la lignée SH-SY5Y Tau.

Figure 27 : Spectre de masse MS/MS du peptide Met11-Tau et AcMet11-Tau à partir du tissu cérébral humain.

Figure 28 : Profil d'expression de la protéine Tau entière et de la forme tronquée Met11-Tau dans le contexte de deux isoformes de Tau.

Figure 29 : Mesure du titre de la réponse immunitaire suite à l'immunisation avec le peptide AcMet11-Tau.

Figure 30 : Screening des hybridomes par la méthode de dosage ELISA indirect.

Figure 31 : Validation des hybridomes par la méthode de Western Blot.

Figure 32 : Validation de la spécificité de l'anticorps monoclonal 2H2/D11.

Figure 33 : Caractérisation par WB du profil électrophorétique des protéines Tau provenant du tissu cérébral de sujets sains et patients Alzheimer.

Figure 34 : Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein du tissu cérébral humain par la technique de Western Blot.

Figure 35 : Le modèle murin transgénique Thy-Tau22.

Figure 36 : Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de l'hippocampe provenant de souris WT et Thy-Tau22 par la technique d'immunohistochimie.

Figure 37 : Validation de l'immunomarquage obtenu chez la souris Thy-Tau22 avec l'anticorps 2H2/D11.

Figure 38 : La forme tronquée AcMet11-Tau co-localise avec une espèce de Tau pathologique dans les neurones en DNF dans la CA1 de souris Thy-Tau22.

Figure 39 : La forme tronquée AcMet11-Tau est détectée précocement dans l'hippocampe de souris Thy-Tau22.

Figure 40 : Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein du cortex frontal de sujets sains et patients Alzheimers par la technique d'immunohistochimie.

Figure 41 : Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de l'hippocampe de sujets sains et patients Alzheimers par la technique d'immunohistochimie.

Figure 42 : La forme tronquée AcMet11-Tau est détectée par ELISA sandwich dans le cortex temporal de patients Alzheimer.

Figure 43 : Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de l'hippocampe et du cortex frontal de patients atteints de la maladie de Pick par la technique d'immunohistochimie.

Figure 44 : La forme tronquée AcMet11-Tau est principalement détectée dans le cortex frontal de patients Alzheimers.

Figure 45 : La forme tronquée AcMet11-Tau n'est pas détectée dans le mésencéphale de patients PSP.

Figure 46 : Profil d'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau4R et AcMet11-Tau3R.

Figure 47 : La N- α -acétylation peut avoir lieu dans un contexte de cellule différenciée.

Figure 48 : Effet de la surexpression de la sous-unité catalytique de la NatB (Naa20).

Figure 49 : Réduction du taux de la sous-unité catalytique de la NatB (Naa20) par la méthode de si-RNA.

Figure 50 : Réduction du taux de la sous-unité catalytique de la NatB (Naa20) par la méthode de lentivirus sh-RNA.

Figure 51 : Implication potentielle de la N- α -acétylation dans la stabilité protéique de la forme tronquée Met11-Tau.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau présentant l'ensemble des tissus cérébraux humains utilisés pendant cette étude.

Tableau 2 : Tableau présentant l'ensemble des anticorps utilisés pendant cette étude.

Tableau 3 : Tableau exposant les caractéristiques des sujets sains et des patients Alzheimer utilisés pour la caractérisation de la troncation de Tau.

Tableau 4 : Tableau exposant les caractéristiques des sujets sains et des patients Alzheimer utilisés pour analyser la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau par WB.

Liste des abréviations

Ac-CoA : Acétyl-CoenzymeA

ADN : Acide désoxy ribonucléique

APP : *Amyloid Precursor Protein*

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine Tri Phosphate

A β : peptide béta-amyloïde

DCB : Dégénérescence Cortico-Basale

DFTP-17 : Démences Fronto-Temporales avec syndrome Parkinsonien liée au chromosome 17

DNF : Dégénérescence neurofibrillaire

GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

kDa : kilo Dalton

LC-MS/MS : *Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry*

LCR : Liquide céphalo-rachidien

MAP : *Microtubule Associated Protein*

MAPT : *Microtubule Associated Protein Tau*

Nat : N- α -acétyltransférase NMDA : N-méthyl-D-aspartate

PDPK : *Proline Directed Protein Kinase*

PHF : *Paired Helical Filament*

PSP : Paralyse Supranucléaire Progressive

SH3 : *Src Homology 3*

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

Tau : *Tubulin Associated Unit*

UTR : *Untranslated Transcribed Region*

Introduction

Chapitre 1 : Physiologie et Pathologie de la protéine Tau

L'histoire débuta en 1975, année à laquelle, Weingarten et ses collaborateurs isolent à partir d'extraits de cerveaux porcins ; un facteur « essentiel » à la polymérisation des microtubules (Weingarten et al., 1975). Suite à cette découverte initiale, ce facteur est nommé Tau pour « *Tubulin Associated Unit* » et rejoint la famille des protéines associées aux microtubules : les MAP (« *Microtubule Associated Protein* »). Dans ce premier chapitre, nous nous intéresserons à la localisation et la structure protéique de Tau, ainsi nous décrirons aussi ses rôles, ses fonctions, et son implication dans la pathologie.

A. La Physiologie de la protéine Tau

A.1. Du gène vers les protéines Tau

La protéine Tau est codée par un unique gène, *MAPT*, « *Microtubule Associated Protein Tau* ». Chez l'Homme, ce gène a été localisé par hybridation *in situ* sur le chromosome 17, au locus 17q21, et s'étend sur une longueur de 134 kilobases (Neve et al., 1986). Cette séquence codante est très conservée à travers les espèces mammifères, par exemple, il existe 88% d'homologie entre la séquence protéique de la protéine Tau murine et humaine (Poorkaj et al., 2001). Ce gène est majoritairement exprimé au niveau du système nerveux central (SNC), dans les neurones (Avila et al., 2004). Cependant, d'autres populations cellulaires présentes dans le cerveau, telles que les cellules gliales possèdent également la protéine Tau, en plus faible quantité (LoPresti et al., 1995 ; Müller et al., 1997). De plus, on retrouve Tau dans certains tissus périphériques tels que le cœur, les reins, les poumons, les muscles et les testicules (Gu et al., 1996 ; Sigala et al., 2014).

Le transcrit primaire de Tau comporte 16 exons numérotés de -1 à 14 (Andreadis et al., 1992). Les exons -1 et 14 sont situés dans la région 5' UTR et 3' UTR (*Untranslated Transcribed Region*) et ne sont pas traduits. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs alors que les exons 2, 3, 4A, 6, 8 et 10 sont alternatifs

(Figure 1). L'épissage alternatif est régulé de manière développementale et tissulaire (Andreadis, 2005). En effet, l'exon 4A est exprimé uniquement dans les neurones du système nerveux périphérique et donne naissance à l'isoforme de Tau particulière de 110 kDa appelée « Big Tau » (Boyne et al., 1995). Il est intéressant de noter que la présence de l'exon 6 peut entraîner l'expression d'une isoforme de Tau déletée de l'extrémité carboxy-terminale (Luo et al., 2004). Ainsi, dans le SNC, les exons 4A et 8 sont exclus, quant à l'exon 6 il est très faiblement exprimé (Wei and Andreadis, 1998).

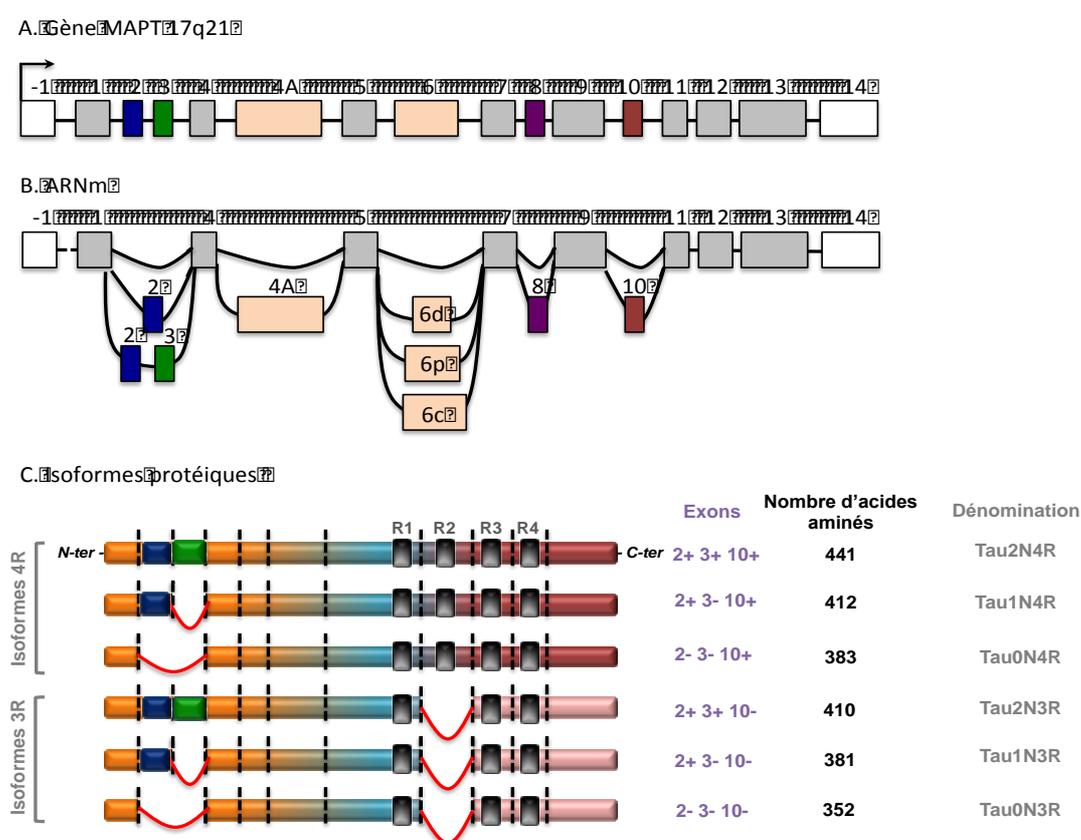


Figure 1 – Du gène MAPT aux six isoformes protéiques de Tau. (A) La structure du gène MAPT qui est localisé sur le chromosome 17 en position 17q21 contient 16 exons. (B) Les exons -1 et 14 ne sont jamais traduits, les exons de couleur grise sont constitutifs alors que les exons colorés subissent l'épissage alternatif. De plus les exons 4A, 6 et 8 ne sont transcrits uniquement dans le système nerveux périphérique. (C) Les différentes isoformes de la protéine Tau présents dans le système nerveux central che l'Homme. (Adapté de Buée et al., 2000).

L'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 conduit à la formation de six isoformes protéiques de Tau appelées réciproquement : 0N3R (2-, 3-,10-), 1N3R (2+, 3-,10-), 2N3R (2+, 3+, 10-), 0N4R (2-, 3-, 10+), 1N4R (2+, 3-, 10+) et 2N4R (2+, 3+, 10+) (**Figure 1**). Cette nomenclature particulière permet de différencier l'inclusion de ces 3 exons alternatifs ; on parle d'isoforme 0N en l'absence de l'exon 2 et 3, 1N en la présence de l'exon 2 mais en l'absence de l'exon 3 et 2N lorsque les exons 2 et 3 sont présents. Il est à noter, que l'inclusion de l'exon 3 est dépendante de celle de l'exon 2 (Andreadis et al., 1995). Concernant l'exon 10, on parle d'isoforme 3R lorsque celui-ci est exclus et 4R lorsqu'il est inclus (pour revue Caillet-Boudin et al., 2015). Ces isoformes ont une taille variable de 352 à 441 acides aminés (AA). De plus, les six isoformes de Tau sont exprimées dans le cerveau adulte avec un équilibre entre les isoformes 3R et 4R (Goedert and Jakes, 1994), et une majorité des isoformes 1N (Hong et al., 1998). A contrario, durant l'embryogenèse, seule l'isoforme 0N3R est exprimée, on la nomme isoforme fœtale (Goedert et al., 1989).

A.2. Structure de la protéine Tau

Du fait de sa composition en acides aminés, la protéine Tau possède un caractère globalement hydrophile et n'adopte pas spécialement de structure conformée comme la plupart des protéines cytosoliques (pour revue, Mandelkow and Mandelkow, 2012). En effet, après des analyses de biophysique telles que la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), etc. (Cleveland et al., 1977a ; Cleveland et al., 1977b) ; il a été montré que Tau était « naturellement non conformée » ou « intrinsèquement désordonnée », à l'exception de quelques courtes séquences qui peuvent former des hélices alpha et des feuillets beta (Schweers et al., 1994 ; Mukrasch et al., 2009). En effet, les séquences $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ et $^{306}\text{VQIVYK}^{312}$ situées dans les motifs répétés sont sujettes à la formation de feuillets beta (Mukrasch et al., 2005). De plus, il a été proposé par la méthode de « *Fluorescence Resonance Energy Transfer* » (FRET) ; que Tau pouvait adopter une conformation dite de « thrombone » dans laquelle les extrémités amino-

terminale et carboxy-terminale créent une interaction intramoléculaire (Jeganathan et al., 2006) (**Figure 2**).

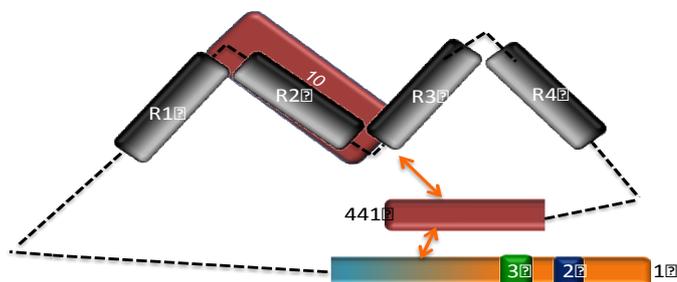


Figure 2 – La conformation dite en « thrombone » de Tau. Des interactions intramoléculaires entre les domaines amino- et carboxy-terminaux de Tau (flèches oranges) entraînent la formation d’une conformation particulière dite de « thrombone ». (Adapté de Jeganathan et al., 2006).

La protéine Tau peut être considérée comme un dipôle du fait de l’existence de différents domaines contenant des charges opposées : un domaine amino-terminal acide donc chargé de manière négative et un domaine carboxy-terminal basique plutôt chargé de manière positive (Sergeant et al., 2008). (**Figure 3**)

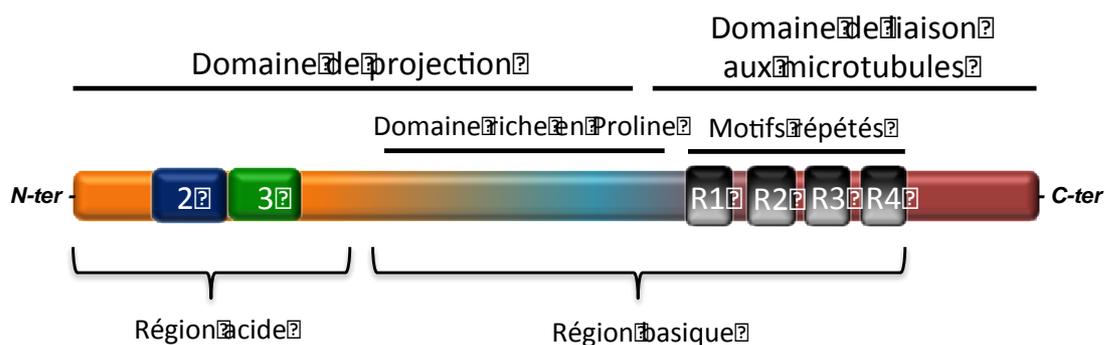


Figure 3 – La structure primaire de Tau. Représentation schématique de l’isoforme Tau2N4R (2+, 3+, 10+), l’isoforme la plus longue observée dans le système nerveux central de l’Homme. La protéine Tau se compose de deux domaines principaux : le domaine de projection et le domaine de liaison aux microtubules, dans ce dernier il y a 4 motifs répétés impliqués dans la liaison aux microtubules. (Adapté de Buée et al., 2000).

Le domaine amino-terminal de Tau (encodé par les exons 1, 2, 3, 4, 5 et 7) possède une taille variable en fonction de l'inclusion ou non des exons 2 et 3, qui renforcent le caractère acide lorsqu'ils sont présents. Ce domaine est également désigné comme le « domaine de projection », ce terme provient du fait qu'il ne lie pas les microtubules mais projette dans le but de créer un espacement entre les microtubules et ainsi réguler le diamètre axonal (Hirokawa et al., 1988 ; Chen et al., 1992). De plus, il a été montré que ce domaine permettait l'interaction avec d'autres éléments du cytosquelette tels que la membrane plasmique (Brandt et al., 1995) et les mitochondries (Jung et al., 1993). Nous pouvons également inclure dans ce domaine de projection, le domaine médian de Tau appelé « domaine riche en Proline (P) » qui contient une centaine d'acides aminés et notamment des motifs PXXP qui interagissent avec des protéines disposant de domaine « *Src Homology 3* » (SH3) (Lee et al., 1998).

Le domaine carboxy-terminal de Tau (encodé par la fin de l'exon 9, les exons 10, 11, 12 et 13) est également appelé « domaine de liaison aux microtubules ». Ce domaine possède trois ou quatre motifs répétés R1, R2, R3 et R4 correspondant à des séquences très conservées de la famille des MAP (Goedert et al., 1989) ; le domaine R2 est présent lorsque l'exon 10 est inclus. Ces motifs interviennent directement dans la liaison de Tau avec les microtubules (Goode et al., 1997 ; Kolarova et al., 2012). Il est décrit que les isoformes 4R permettent une stabilisation plus importante des microtubules que les isoformes 3R (Goedert et Jakes, 1990).

A.3. Fonctions de la protéine Tau

Comme Tau est initialement décrite comme une MAP, sa fonction la plus étudiée est celle de la régulation de la stabilité et de la dynamique des microtubules. Par conséquent, de nombreuses études se sont focalisées sur cette fonction majoritaire mais de plus récentes études ont montré que Tau possédait également d'autres rôles au

niveau nucléaire et dans les voies de signalisation cellulaire (pour revue, Guo et al., 2017).

A.3.a. Régulation de la dynamique microtubulaire

A.3.a.1. Les microtubules : constituant du cytosquelette

Les microtubules sont des éléments du cytosquelette qui permettent d'assurer de nombreux rôles cellulaires : motilité, morphogénèse, transport cellulaire et division cellulaire. Ils sont formés d'hétérodimères de tubuline alpha et beta qui s'assemblent longitudinalement pour former un protofilament. Un microtubule contient de manière générale 13 protofilaments qui s'organisent de manière hélicoïdale pour former un cylindre creux d'environ 25nm de diamètre (Amos et Schlieper, 2005 ; Conde et Caceres, 2009). L'élongation du microtubule également appelée polymérisation ; est sous le contrôle de l'hydrolyse du Guanosine Triphosphate (GTP) en Guanosine Diphosphate (GDP) au niveau du monomère beta, lorsque celle-ci a lieu les dimères peuvent interagir entre eux (Melki et al., 1996).

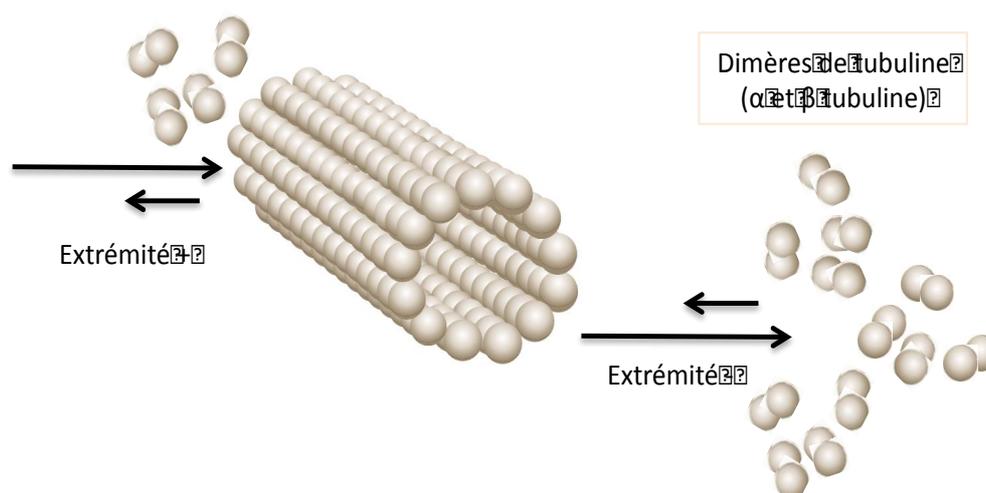


Figure 4 – Représentation schématique de la dynamique microtubulaire. Les microtubules sont des éléments dynamiques, ils possèdent une extrémité dite + où l'incorporation des dimères de tubuline est favorisée par rapport à l'extrémité dite – où les microtubules ont tendance à se désassembler.

La polymérisation s'effectue à l'extrémité + du microtubule, orientée vers la périphérie de la cellule, alors que le raccourcissement aussi appelé dépolymérisation s'effectue à l'extrémité - (Figure 4). Ainsi, les microtubules sont définis comme des polymères dynamiques et instables de tubuline (Mitchison et Kirschner, 1984). Les microtubules sont présents dans tout les types cellulaires, mais il est décrit qu'ils sont particulièrement stables dans les neurones (Seitz-Tutter et al., 1988). En effet les neurones sont des cellules hautement différenciées et organisées en trois parties : le soma, l'axone et les dendrites ; la structure des microtubules est très importante au niveau de l'axone. (Yamada et al., 1970).

A.3.a.2. Interaction des microtubules avec les protéines associées aux microtubules (MAP)

Comme décrit précédemment, Tau est une MAP, elle se lie aux microtubules grâce à son domaine de liaison aux microtubules, notamment par ses motifs répétés (Kadavath et al., 2015). Ces motifs sont séparés par des « *inter-repeat* » : iR1, iR2 et iR3, qui pourraient également jouer un rôle dans l'affinité de liaison aux microtubules. En effet, il a été montré que l'absence de l'iR1 (qui n'est présent que dans les isoformes 4R) diminue l'affinité de Tau pour les microtubules (Goode et Feinstein, 1994). De plus, et dans ce sens, les isoformes 4R montrent une affinité plus importante pour les microtubules que les isoformes 3R (Panda et al., 2003). En outre des motifs répétés, la fin du domaine riche en Proline a également été montrée comme une région de Tau pour se lier aux microtubules (Goode et al., 1997). Quant au domaine de projection, il n'intervient pas dans la liaison microtubulaire, mais plutôt dans l'espacement entre les microtubules ; dans le système nerveux périphérique, l'exon 4A est présent et permet d'augmenter le diamètre axonal (Boyne et al., 1995). Le mécanisme de liaison reste encore indéterminé mais les études montrent une liaison de manière ionique, en effet les motifs répétés sont chargés positivement alors que les microtubules sont chargés négativement (Jho et al., 2010).

De nombreuses études mécanistiques *in vitro* et *in cellulo*, ont démontré que la liaison de Tau sur les microtubules permettait la modulation de différents paramètres. Dans un premier temps, il a été montré que Tau agissait comme un facteur permettant d'accroître la vitesse de polymérisation des microtubules (Witman et al., 1976). Dans un second temps, des études ont montré que la longueur de polymérisation d'un microtubule isolé était neuf fois supérieure en présence de Tau (Drechsel et al., 1992). Ainsi, la protéine Tau intervient directement dans la dynamique microtubulaire, et sa dérégulation entraîne des conséquences cellulaires diverses.

Chez les mammifères, en plus de la protéine Tau, il existe d'autres MAP structurales qui interagissent avec les microtubules. D'une part, la famille des MAP de type I qui contient trois membres : MAP1A qui est surtout retrouvée dans les dendrites (Schoenfeld et al., 1989) ; MAP1B qui est retrouvée dans l'axone et les dendrites ainsi que dans les cellules gliales et MAP1S qui est exprimée de manière ubiquitaire dans l'organisme (Bloom et al., 1985). Contrairement à Tau, ces MAP possèdent un poids moléculaire élevé, compris entre 120 kDa et 350 kDa et une structure qui n'est pas organisée en domaines distincts (pour revue, Halpain et Dehmelt, 2006). D'autre part, la famille des MAP de type II qui contient trois membres également : la protéine Tau, MAP4 et MAP2. La protéine MAP2 possède trois isoformes et se localise préférentiellement au niveau des dendrites (Garner et Matus, 1988). Elle possède une structure semblable à celle de Tau, avec un domaine de liaison aux microtubules montrant 67% d'identité avec la protéine Tau (Lewis et al., 1988). En plus de ces MAP structurales, on peut également noter la présence de MAP motrices désignées sous le terme de moteurs moléculaires, telles que la kinésine et la dynéine (pour revue, Mallik and Gross, 2004).

A.3.b. Régulation du transport axonal

Les protéines néo-synthétisées au niveau du corps cellulaire sont amenées par les moteurs moléculaires vers les terminaisons axonales et synaptiques, en empruntant les microtubules comme un « rail » (pour revue, Goldstein and Yang, 2000). Ainsi ces

MAP motrices permettent le transport de « cargots » tels que les mitochondries, les neurotransmetteurs et les vésicules. La kinésine permet le transport axonal antérograde (du soma vers les synapses) alors que la dynéine permet le transport axonal rétrograde (des synapses vers le soma) (Kanaan et al., 2013) (**Figure 5**).

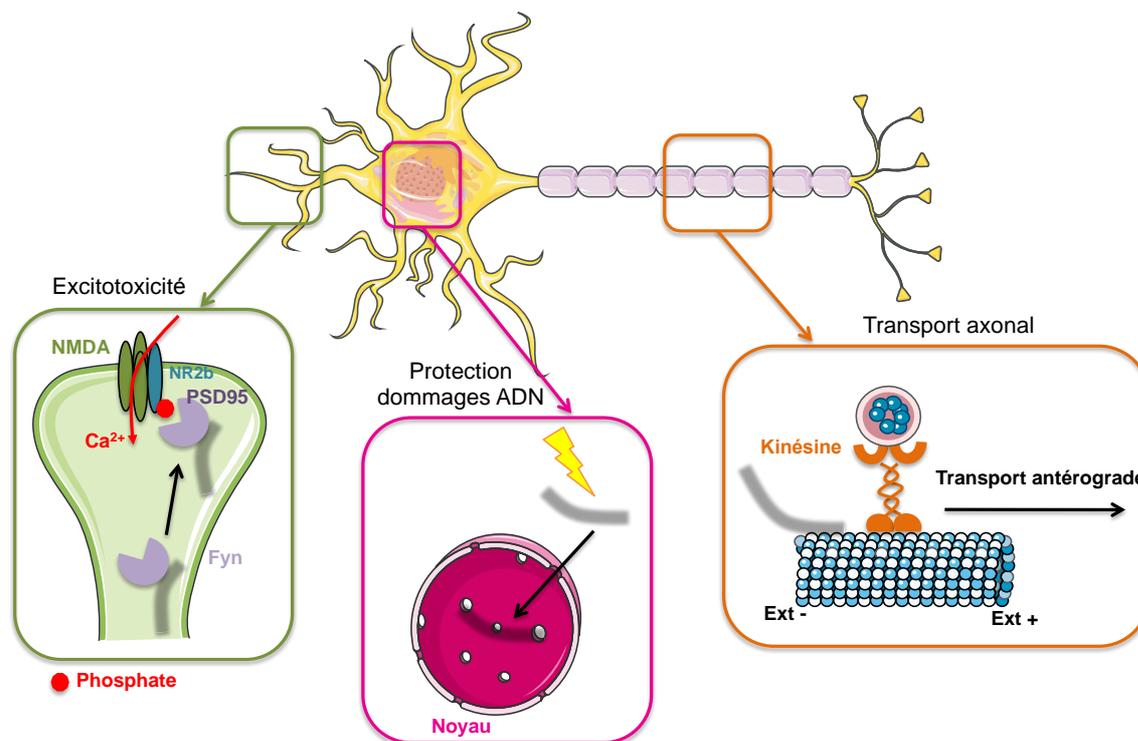


Figure 5 – De nombreuses fonctions décrites pour la protéine Tau. En plus de jouer un rôle majoritaire dans la régulation de la dynamique microtubulaire, la protéine Tau possède également des rôles dans la signalisation cellulaire, notamment au niveau de la synapse ; dans la protection de l'ADN et dans la régulation du transport axonal.

En plus de ces moteurs moléculaires qui jouent un rôle essentiel dans la régulation du transport axonal, il a été montré que la surexpression de Tau avait pour conséquence une inhibition du transport antérograde, visualisée par l'accumulation de mitochondries et peroxysomes au niveau du corps cellulaire (Stamer et al., 2002). En parallèle, il a été montré que la surexpression de Tau empêche la liaison de la kinésine sur les microtubules (Seitz et al., 2002). En effet Tau est distribuée selon un gradient proximal-distal, avec une concentration faible au niveau du corps cellulaire et une concentration forte vers les terminaisons axonales. Concernant le transport rétrograde, il a été montré que Tau pouvait également perturber celui-ci, en inversant la direction

de la dynéine (Dixit et al., 2008). De plus, des modifications dans la partie amino-terminale de Tau ont montré que Tau n'était plus capable de lier la dynactine, une protéine appartenant au complexe de la dynéine (Magnani et al., 2007). Ces résultats ont été confortés par des études menées *in vivo*, il a été montré que la surexpression de Tau dans le système nerveux central entraînait des troubles du transport axonal (Zhang et al., 2005a).

A.3.c. Régulation de la neurogenèse et de la croissance neuritique

Comme décrit précédemment, au cours de l'embryogenèse, les neurones n'expriment que l'isoforme fœtale de Tau. Cette expression unique permettrait aux neurones immatures de se développer et de migrer plus facilement, en effet, l'isoforme fœtale possède une affinité moindre pour les microtubules que les isoformes 4R, ainsi le cytosquelette serait plus modulable (Fuster-Matanzo et al., 2012). Au cours du développement, on observe chez la souris et le rat un *shift* des isoformes 3R vers les isoformes 4R à un stade post-natal d'environ 10 jours (Kosik et al. 1989). Cependant, chez le rat adulte ; l'expression des isoformes 3R persistent en plus faible quantité que les isoformes 4R (Bullman et al., 2009), notamment dans la zone sous-granulaire du gyrus denté connu pour être l'un des sièges de la neurogenèse adulte (Bullman et al., 2007).

L'organisation du réseau microtubulaire est importante dans un type cellulaire hautement différencié comme le neurone. La protéine Tau, de par son interaction avec les microtubules joue un rôle dans la croissance neuritique. Il a notamment été montré que la localisation de Tau varie entre les neurones immatures et matures, où Tau est respectivement localisée dans les dendrites puis dans l'axone (Hirokawa et al., 1996). Quelques études suivantes ont démontré que dans des cultures primaires issues de souris déficientes pour Tau, les neurones présentent un retard de croissance neuritique (Dawson et al., 2001). De plus, la déficience en Tau altère également la morphologie des dendrites (Pallas-Bazarra et al., 2016). A contrario, lorsque Tau est surexprimée dans des cellules de neuroblastome murin, elle entraîne la formation de prolongements

neuritiques (Yoshizaki et al., 2004). Par ailleurs, dans des lignées issues de neuroblastome humain (SH-SY5Y) et de phéochromocytome de rat (PC12) différenciées, il a été observé une corrélation entre l'augmentation de l'expression de Tau et l'extension des prolongements neuritiques (Smith et al., 1995 ; Drubin et al., 1985). Ainsi, la protéine Tau est impliquée dans les processus de différenciation neuronale et de formation des axones.

A.3.d. Régulation de la plasticité synaptique et de la signalisation cellulaire

Les fonctions décrites précédemment mettaient en avant le domaine carboxy-terminal de Tau, mais par la présence de son domaine médian riche en Proline, Tau est capable d'interagir avec des partenaires protéiques de la famille Src au niveau de la membrane plasmique (Lee et al., 1998). Cette interaction a lieu entre les motifs PXXP (au nombre de sept) de Tau et les domaines SH3 de certaines protéines impliquées dans la signalisation cellulaire telles que Fyn, Src, PLCY (phospholipase CY), PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Reynolds et al., 2008a). Aujourd'hui, les interactions de Tau avec ses différents partenaires protéiques ne donnent pas lieu à une meilleure compréhension des significations biologiques. Cependant, il a été mis en évidence que Tau régulait le transit de Fyn vers la synapse (Ittner et al., 2010), car en absence de Tau la protéine Fyn n'est plus localisée à la synapse pour réaliser sa fonction. Deux années plus tard, une autre équipe montrait que Tau interagissait avec PSD95 (*Postsynaptic Density Protein 95*) (Mondragon-Rodriguez et al., 2012). Il est à noter que cette kinase et cette protéine d'échaffaudage permettent la régulation de l'activité des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) impliqués dans la plasticité synaptique (Hunt and Castillo, 2012). Ainsi, par l'interaction avec différents partenaires protéiques, Tau contribue à l'activation des récepteurs NMDA et joue un rôle dans la plasticité synaptique.

A.3.e. Protection de l'ADN

Initialement, Tau est décrite comme une protéine cytosolique, mais elle a également été retrouvée dans le compartiment nucléaire de neuroblastome humain surexprimant la protéine Tau (Loomis et al., 1990). De plus, dans des conditions physiologiques, la présence de Tau dans le noyau a été observée dans des cultures primaires de neurones corticaux de souris (Sultan et al., 2011) et dans le cerveau de souris (Violet et al., 2014). Ces études ont permis de montrer qu'en cas de stress oxydant ou thermique, Tau protégerait l'ADN de ces facteurs néfastes ; alors qu'en l'absence de Tau cette protection est perdue et une augmentation des dommages à l'ADN est observée. L'interaction entre Tau et l'ADN a été validée par la méthode de retard sur gel (Hua and He, 2002). Cette interaction a lieu par l'intermédiaire du domaine riche en Proline et du domaine carboxy-terminal avec le petit sillon de l'ADN (Wei et al., 2008). Des études *in cellulo* ont montré que Tau était notamment présente au niveau de l'hétérochromatine constitutive au sein du nucléole ; lieu de synthèse des acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr) (Sjöberg et al., 2006). Concernant la nature de la protéine Tau nucléaire, une étude montre que le noyau de neurones de cerveaux de souris serait enrichi en isoforme 1N3R et 1N4R (Liu et al., 2013). Ainsi, ces études montrent un rôle de Tau en dehors du compartiment cytosolique.

La protéine Tau ou plutôt les protéines Tau issues de l'épissage alternatif, à partir du transcrit primaire, possèdent une structure organisée en deux domaines majoritaires : le domaine de projection et le domaine de liaison aux microtubules. La fonction la plus étudiée et caractérisée de cette protéine est la régulation de la dynamique microtubulaire, mais de nombreuses autres fonctions ont été découvertes. En effet, Tau intervient dans la signalisation cellulaire, l'ADN, le transport axonal et la plasticité synaptique. Elle apparaît donc comme une protéine centrale dans le système nerveux, notamment dans la population neuronale.

B. La physiopathologie de la protéine Tau

Le début du récit de la pathologie Tau démarra bien avant sa découverte. En 1901, Monsieur Aloïs Alzheimer, psychiatre et neuropathologiste allemand étudie le cas d'Auguste Deter, une patiente de 51 ans atteinte de démence. Elle présentait différents symptômes : « mutisme, troubles de la mémoire, désorientation et hallucinations ». Au premier abord, ces symptômes s'apparentaient plus à des troubles psychologiques et psychiatres. Cependant, en 1906, au décès de la patiente et après un examen *post-mortem* cérébral, Monsieur Alzheimer observa une atrophie cérébrale générale. Puis il réalisa un marquage argentique qui révéla la présence de deux lésions neuropathologiques : « les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires » (Alzheimer et al., 1995). Ainsi, il conclut que cette patiente présentait une « maladie particulière du cortex cérébral ». C'est en 1912 que le professeur Emil Kraepelin utilise le terme de « maladie d'Alzheimer » pour décrire cette pathologie. Enfin, ce n'est que dans les années 80 que les composants des deux lésions neuropathologiques sont découverts : la protéine bêta-amyloïde ($A\beta$) comme constituant majeur des plaques séniles (Glennner et al., 1984) et la protéine Tau agrégée dans les dégénérescences neurofibrillaires (Brion et al., 1985).

B.1. Les Tauopathies

Comme décrit précédemment, la protéine Tau est retrouvée sous forme d'agrégats intra-neuronaux dans la maladie d'Alzheimer, ces agrégats constituent la lésion histopathologique caractéristique dénommée dégénérescence neurofibrillaire. Toutefois, cette lésion est aussi retrouvée dans un panel de pathologies neurodégénératives regroupées sous le terme de « Tauopathies ». Dans ce groupe, on dénombre une vingtaine de Tauopathies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Pick, la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence cortico-basale (DCB) ou encore la dégénérescence lobaire fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (DFTP-17) (Sergeant et al., 2005).

B.1.a. Classification des Tauopathies

Avec l'évolution de la biologie moléculaire, de la génétique et de la biochimie, il a été établi que l'accumulation de protéines Tau anormales est un point commun aux Tauopathies, cependant il existe une hétérogénéité entre les pathologies. Une classification biochimique, désignée sous le terme de « code barre des Tauopathies » a été réalisée (Figure 6).

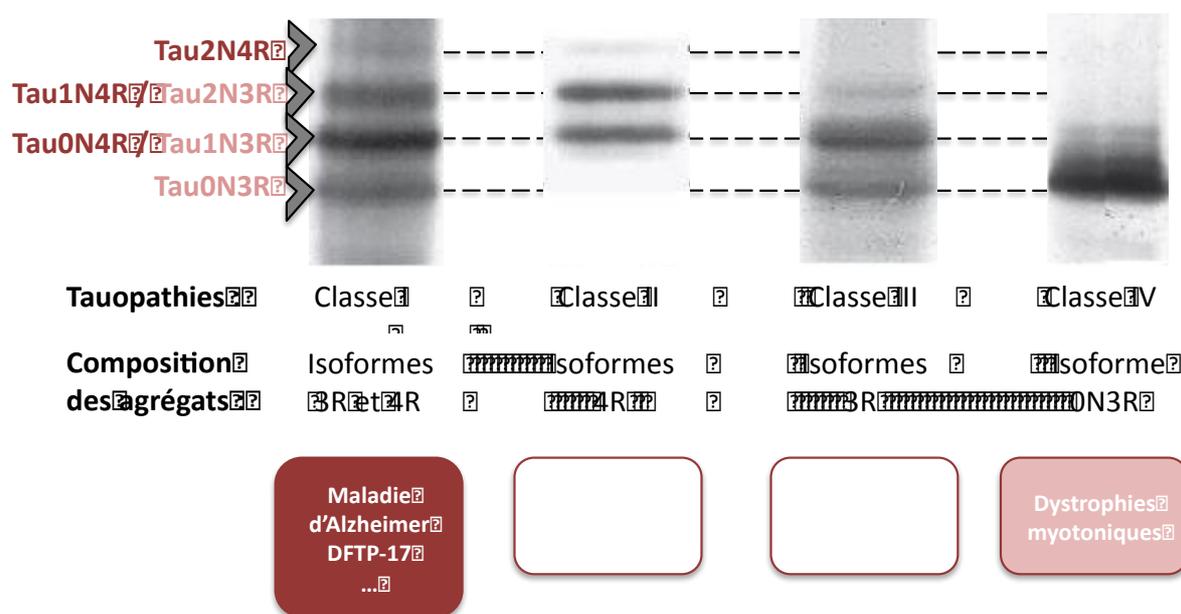


Figure 6 – Le « code barre » des Tauopathies. L'immunoempreinte des protéines Tau provenant de tissus de patients atteints de différentes Tauopathies est réalisée via l'anticorps monoclonal AD2 reconnaissant les sites phosphorylés en Ser396/404. Après analyse par WB, il ressort 4 profils électrophorétiques différents permettant de distinguer 4 classes de Tauopathies en fonction de la nature des agrégats de Tau. La classe I correspond aux Tauopathies dans lesquelles l'ensemble des isoformes sont présentes dans les agrégats. Dans la classe II les agrégats ne sont composés que des isoformes 4R et dans la classe III que des isoformes 3R. Pour la classe IV seule l'isoforme Tau0N3R constitue les agrégats. (Adaptée de Sergeant et al., 2005).

Ainsi, 4 classes de Tauopathies ont été définies sur la base de la composition en protéines Tau présentes au sein des agrégats dans le cerveau des patients. La classe I regroupe de nombreuses pathologies dont la maladie d'Alzheimer et les DFTP-17 (Spillantini et al., 1998b), le profil biochimique de cette classe montre un quadruplet électrophorétique concordant à l'agrégation de toutes les isoformes de Tau (Goedert et al., 1992 ; Sergeant et al., 1997). La classe II regroupe la PSP, la DCB et les démences

à grains argyrophiles (Flament et al., 1991 ; Buée-Scherrer et al., 1996b), le profil biochimique de cette classe montre la présence unique des isoformes 4R au sein des agrégats. A contrario, la classe III qui comporte la maladie de Pick montre un profil biochimique avec la présence unique des isoformes 3R au sein des agrégats (Delacourte et al., 1996). Enfin, la classe IV regroupe les dystrophies myotoniques, dans lesquelles on ne retrouve que l'isoforme fœtale agrégée.

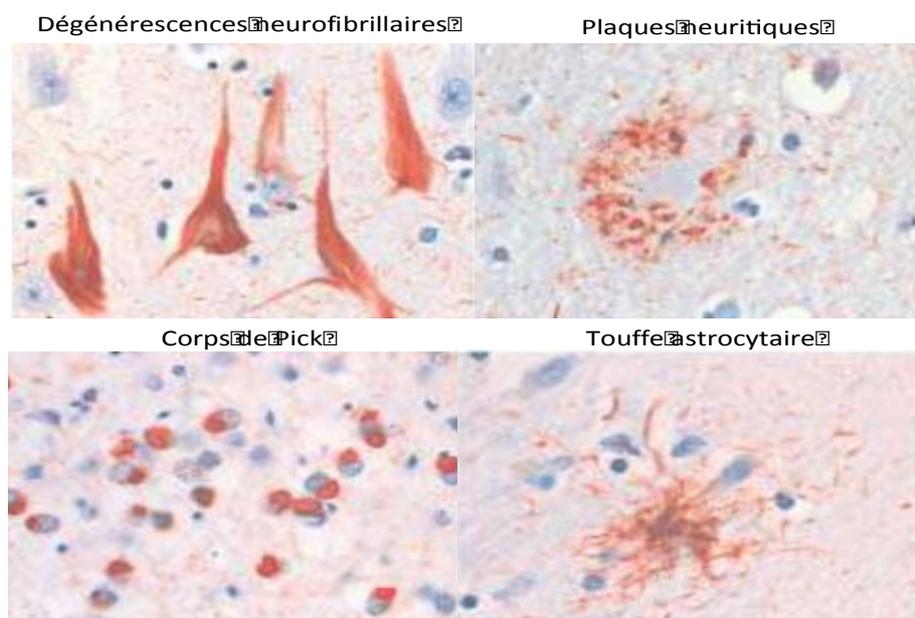


Figure 7 – Les différentes inclusions de Tau permettent l'identification des Tauopathies. Les Tauopathies regroupent un ensemble de maladies neurodégénératives caractérisées par l'agrégation de la protéine Tau. Cependant, chaque Tauopathie possède des particularités notamment pour la structure des agrégats de Tau. Ici, l'immunohistochimie sur tissu cérébral humain est réalisé avec l'anticorps AT8 (phosphorylation des résidus Ser202 et Thr205). Dans la maladie d'Alzheimer, les agrégats de Tau prennent la forme de dégénérescence neurofibrillaire et de plaques neuritiques. Au contraire dans la maladie de Pick, les agrégats sont très denses et forment les corps de Pick. Cette accumulation de Tau est aussi détectée dans les astrocytes au niveau de la Paralyse Supranucléaire Progressive (PSP) dans laquelle on observe des touffes astrocytaires. (Extrait de Tolnay and Probst, 2003).

Au niveau histologique, une hétérogénéité est également à noter au sein des Tauopathies (Figure 7). Dans la maladie d'Alzheimer, les agrégats de protéines Tau forment la dégénérescence neurofibrillaire ; dans la maladie de Pick ces agrégats forment les corps de Pick alors que dans la PSP on retrouve des agrégats au sein des

astrocytes et ils forment les touffes astrocytaires (Kahlson and Colodner, 2015 ; Tolnay and Probst, 2003).

B.1.b. La maladie d'Alzheimer : Tauopathie majoritaire

B.1.b.1. Généralités

Longtemps confondue avec le vieillissement, la maladie d'Alzheimer a mis des années avant d'être reconnue comme telle. Elle est devenue en plusieurs années, un véritable fardeau et un problème majeur de santé publique. En effet, c'est la démence la plus fréquente, elle représente 50 à 70% des cas de démences (Fratigioni et al., 1999). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé il y aurait 47,5 millions de personnes atteintes par cette pathologie dans le monde. Il faut noter que les prévisions pour les années à venir ne sont pas très bonnes (environ 75 millions de personnes affectées en 2030), cette prévision prendrait en compte « l'augmentation du nombre de cas dans les pays sous développés ».

B.1.b.2. Facteurs de risques

La maladie d'Alzheimer est considérée comme une maladie multifactorielle, en effet de multiples études ont montré l'implication de facteurs de risques environnementaux ainsi que de facteurs de risques génétiques.

B.1.b.2.a Facteurs environnementaux

Le facteur environnemental majeur associé à la maladie d'Alzheimer est l'âge (Coria et al., 1994), en effet, après 65 ans le risque de développer cette pathologie double environ tout les cinq ans. Outre le vieillissement, il y a de nombreux autres facteurs environnementaux associés à un risque de développement de la pathologie. On peut notamment citer, le tabagisme, la dépression, l'hypertension artérielle, etc.

(Norton et al., 2014). Ainsi, tous ces facteurs sont liés directement aux cas sporadiques de la maladie d'Alzheimer qui représentent 90 à 95% des cas. A l'inverse de ces facteurs néfastes, il a également été démontré que certains facteurs bénéfiques permettaient de retarder l'apparition de la pathologie. Parmi ces facteurs favorables, on peut citer, la pratique d'une activité physique, la consommation de caféine et de vin en quantité raisonnable, le maintien d'une alimentation équilibrée, etc.

B.1.b.2.b Facteurs de risques génétiques

Outre les facteurs environnementaux, il a été montré que la présence de certains allèles de l'APOE (ApolipoprotéineE) représente à un facteur de risque de développement de la maladie d'Alzheimer. Le gène de l'APOE existe sous trois allèles ; $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$; des études ont montré que la présence d'une à deux copies de l'allèle $\epsilon 4$ augmente le risque de développer la maladie d'Alzheimer de 3 à 15 fois (Farrer et al., 1997). A l'inverse, la présence de l'allèle $\epsilon 2$ serait protectrice (Raber et al., 2004). Plus récemment et ce depuis 2007, des études d'association à l'échelle du génome (*Genome Wide Association Study or GWAS*) ont identifié une vingtaine de locus de susceptibilité génétique (Grupe et al., 2007). Tout d'abord, ces études ont confirmé le gène de l'APOE comme le facteur de risque le plus significatif pour la maladie d'Alzheimer (Coon et al., 2007). Ensuite, les premières *GWAS* ont mis en évidence les loci de susceptibilité : BIN1 (*Bridging integrator1*), CLU (*Clusterin*), PICALM (*Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein*) et CR1 (*Cell-surface receptor 1*) (Chapuis et al., 2013 ; Harold et al., 2009 ; Lambert et al., 2009). Par la suite, des gènes de susceptibilité supplémentaires ont été découverts et l'ensemble de ces gènes sont impliqués dans 4 voies principales : voie amyloïde, l'inflammation et le système immunitaire, le transport des lipides ainsi que le fonctionnement synaptique (pour revue, Tosto and Reitz, 2013). En plus des formes sporadiques, les formes familiales de la maladie d'Alzheimer représentent un faible pourcentage compris entre 1 à 2% des cas (Tanzi, 2012). Ces formes génétiques sont expliquées par la présence de mutations autosomales dominantes sur trois gènes

codant pour les présénilines 1 et 2 et l'APP (*Amyloid Precursor Protein*) (Chartier-Harlin et al., 1991 ; Sherrington et al., 1996). Le gène APP codant pour le précurseur des peptides synthétisés tels que le peptide A β , et les autres gènes codant pour les protéases impliquées dans le métabolisme de l'APP. Ainsi les mutations sur ces gènes entraînent une dérégulation de cette voie (Loy et al., 2014).

B.1.b.3. Aspects cliniques

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par une progression de troubles cognitifs. De manière générale, cette pathologie est subdivisée en 3 phases cliniques. La première phase est nommée « *Mild Cognitive Impairment* » (MCI), elle correspond à une phase prodromique durant laquelle on observe des symptômes précurseurs tels que des troubles de la mémoire à court-terme avec une difficulté à se souvenir de faits récents et à sauvegarder de nouvelles informations. Ces atteintes mnésiques sont la conséquence d'une altération cérébrale localisée dans l'hippocampe, région importante pour les processus de mémorisation. La deuxième phase correspond au stade modéré, dans cette phase les lésions commencent à se propager vers d'autres régions cérébrales, notamment vers le cortex ce qui se traduit par de nombreux symptômes. On peut notamment citer l'apparition de troubles du langage (aphasie), de l'humeur, de l'identification (agnosie) et de l'exécution des mouvements (apraxie), ces troubles étant complétés par une altération de la mémoire à long-terme. L'accumulation de tout ces troubles entraîne une perte d'autonomie générale du patient qui est épaulé par ses proches, les associations et de nombreux centres médicaux qui ont vu le jour ces dernières années (France Alzheimer). La dernière phase se traduit par un alitement perpétuel, une absence de communication, de nutrition et la survenue de problèmes médicaux diverses qui conduisent au décès du patient.

« « Alzheimer » ... c'est un mal qui vole les cœurs, les âmes et les souvenirs »,
Nicholas Sparks, écrivain

B.1.b.4. Diagnostic

Actuellement, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est réalisé à l'aide de plusieurs méthodes, on parle de « diagnostic pluridisciplinaire ». En effet, les patients suivent une batterie de tests neuropsychologiques standardisés comme le MMSE (*Mini Mental State Evaluation*) qui contient une série de questions ou de tâches à réaliser avec un score final compris entre 0 et 30 ; un score inférieur à 24 correspond à une suspicion de démence (Ashford et al., 1989). Ces tests sont renforcés par des clichés d'imagerie, notamment par l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) qui révèle une atrophie hippocampique et par le TEP (Tomographie à Emission de Positons) qui révèle une diminution de l'activité métabolique hippocampique (Laakso et al., 1998 ; Ishii, 2014). De plus, les patients effectuent un bilan médical général comprenant une ponction lombaire du LCR (Liquide Céphalo-Rachidien) afin de quantifier la protéine Tau totale, la protéine Tau phosphorylée et le peptide A β 42 (Dumurgier et al., 2013 ; Cicognola et al., 2016). Tous ces examens permettent d'orienter le diagnostic sur la maladie d'Alzheimer et de mettre en place un protocole de soin adapté, mais le diagnostic certain est validé après le décès du patient, notamment lors de l'observation des lésions présentes dans le cerveau. On peut ainsi remarquer le manque crucial d'outils de diagnostic plus performant et plus précoce, en effet, les tests décrits précédemment sont réalisés lorsque les patients présentent déjà de nombreux symptômes.

B.1.b.5. Les lésions neuropathologiques

B.1.b.5.a. Aspects macroscopiques

A l'échelle macroscopique, les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer montrent une atrophie sévère du cortex cérébral accompagnée d'une augmentation du volume des ventricules cérébraux (**Figure 8**). Les premières régions cérébrales touchées sont localisées dans le lobe temporal médian ; plus particulièrement le cortex entorhinal, l'amygdale et l'hippocampe (Braak and Braak, 1991). Puis cette atrophie se propage vers le reste du lobe temporal et également vers

le lobe frontal (Migliaccio et al., 2015). Cette atrophie est le résultat direct de la mort neuronale mais également de la perte synaptique (Terry, 2000).

B.1.b.5.b. Aspects microscopiques

Pour des observations plus précises, la technique de marquage à l'argent avait été utilisée par Aloïs Alzheimer et Oscar Fischer pour mettre en évidence les deux lésions histopathologiques : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les plaques amyloïdes. (**Figure 8**)

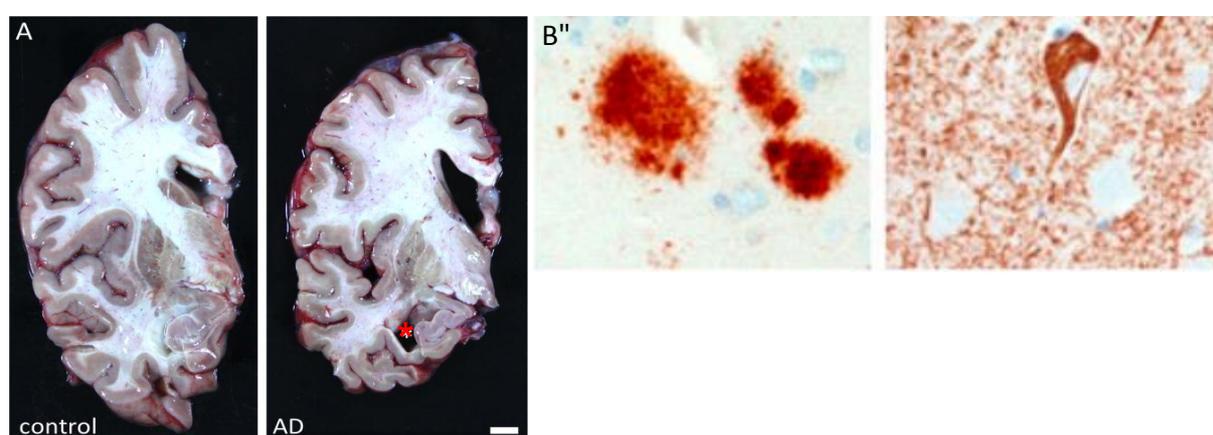


Figure 8 – Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer. (A) L'analyse macroscopique du cerveau de patient Alzheimer montre une atrophie corticale et hippocampique (*). (B) L'analyse microscopique de cerveau provenant de patient Alzheimer montre à gauche les plaques amyloïdes mis en évidence par immunohistochimie utilisant l'anticorps 33.1.1 dirigé contre le peptide A β . Et à droite la dégénérescence neurofibrillaire mise en évidence par immunohistochimie utilisant l'anticorps PHF1 dirigé contre la protéine Tau hyperphosphorylée. (Extrait de Spiers-Jones et al., 2014 ; Murray et al., 2014).

B.1.b.5.a.1. Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont constituées de l'accumulation en extra-cellulaire de peptides A β possédant une masse moléculaire d'environ 4,5 kDa (Glenner et al., 1984). Ce peptide est issu de clivages protéolytiques successifs d'une protéine commune ; l'APP (Kang et al., 1987). L'APP est une protéine transmembranaire dont la fonction n'est pas bien connue aujourd'hui, elle est soumise à deux voies de dégradation différentes : la voie amyloïdogénique et la voie non-amyloïdogénique.

C'est par la voie amyloïdogénique que le peptide A β est produit, notamment par l'action séquentielle des β -sécrétase et γ -sécrétase (Haass, 2004). On parle généralement du peptide A β , mais cette voie génère deux types de peptides A β ; l'A β 40 et l'A β 42, constitués respectivement de 40 et 42 acides aminés. A contrario, la voie non-amyloïdogénique est également appelée « voie de protection » car elle ne conduit pas à la formation de peptides A β , mais à la synthèse de sAPP α (*soluble APP*) qui possède des fonctions neuroprotectives (Chasseigneaux and Allinquant, 2012). Ainsi, dans la maladie d'Alzheimer l'accumulation de peptides A β pourrait être la conséquence d'un déséquilibre en faveur de la voie amyloïdogénique. De plus, il faut se rappeler et inclure dans ce déséquilibre les mutations décrites précédemment sur le gène de l'APP et des présénilines 1 et 2 qui sont des enzymes impliquées dans l'activité de la γ -sécrétase (Ringman and Coppola, 2013). Même si toutefois, ces mutations ne représentent qu'un très faible pourcentage des cas de maladie d'Alzheimer. Concernant la distribution des plaques amyloïdes, il a été montré que ces plaques progressent dans les régions cérébrales selon les stades de Thal, avec une présence initiale dans le néocortex puis dans le cortex entorhinal, l'hippocampe et les régions plus profondes comme le thalamus et l'hypothalamus (Thal et al., 2002) (Figure 9).

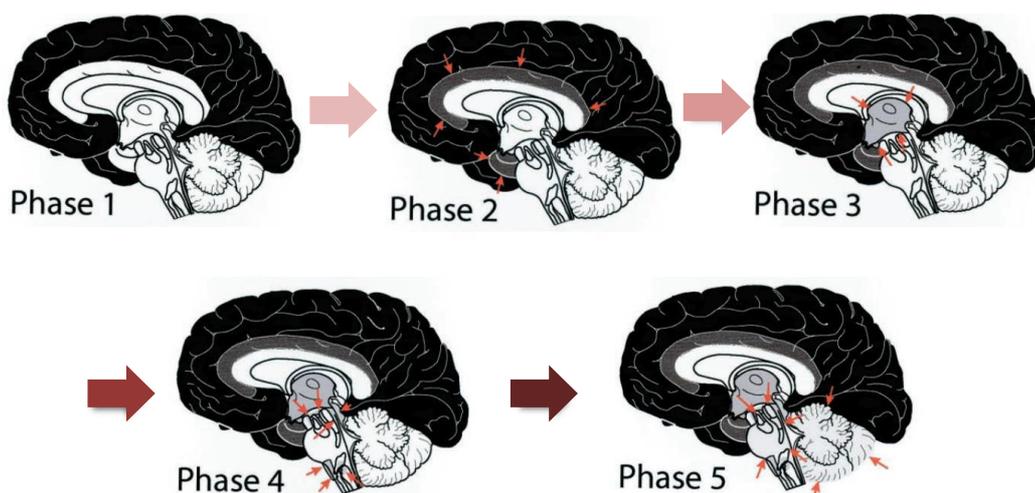


Figure 9 – Les cinq stades de développement de la pathologie amyloïde dans la maladie d'Alzheimer. Lors de la phase 1, les plaques amyloïdes sont localisées dans l'isocortex (en noir). Puis lors des phases 2 et 3 elles envahissent l'hippocampe, l'amygdale et le striatum. Dans les phases 4 et 5 il y a une atteinte du tronc cérébral et du cervelet. (Adaptée de Thal et al., 2002).

B.1.b.5.a.2. Les dégénérescences neurofibrillaires

Après avoir été découvertes à l'aide d'un marquage argentique, l'observation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) par microscopie électronique a permis de mettre en évidence leur structure fibrillaire. En effet, il a été montré en 1963 que les DNF présentent des filaments appariés en hélice, ces filaments sont plus communément appelés PHF (*Paired Helical Filament*) (Kidd, 1963). Quelques années après cette découverte et grâce à l'analyse biochimique de PHF isolés de cerveaux provenant de patients Alzheimer ; la composition des DNF a été identifiée. Il a été démontré que les DNF étaient majoritairement composés d'agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées ainsi que du peptide A β , MAP2 et l'ubiquitine (Brion et al., 1985 ; Kosik et al., 1984 ; Masters et al., 1985 ; Mori et al., 1987) ; ces résultats majeurs ont été confirmés par d'autres équipes (Grundke-Iqbal et al., 1986 ; Ihara et al., 1986 ; Delacourte and Defossez, 1986). Tau étant une phospho-protéine, prenons ici le temps de définir l'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale. L'hyperphosphorylation correspond à l'augmentation du nombre de sites phosphorylés au sein d'une même protéine ou à l'augmentation générale du nombre de protéines phosphorylées sur un site de phosphorylation. De manière opposée, la phosphorylation anormale a lieu sur des sites qui ne sont pas phosphorylés en condition physiologique. Nous détaillerons dans le prochain chapitre, les modifications post-traductionnelles ayant lieu sur Tau, notamment la phosphorylation. Contrairement aux dépôts amyloïdes qui peuvent dans quelques cas être liés aux mutations de plusieurs gènes, les DNF dans ne sont pas liées à une mutation du gène codant pour la protéine Tau ; à l'exception des DFTP-17 qui sont caractérisées par un ensemble de mutations présentes sur le gène MAPT (pour revue, Ghetti et al., 2015).

Concernant la distribution des DNF, une évolution spatio-temporelle a été observée et a donné naissance aux « stades de Braak » ; ainsi l'évolution de la maladie d'Alzheimer peut être divisée en six stades (Braak and Braak, 1995 ; Braak et al., 2011). Les stades I et II sont dits « stades trans-entorhinaux », le début de la DNF est donc localisé dans le cortex trans-entorhinal et le locus cœruleus ; les stades III et IV

sont dits « stades limbiques », ici les DNF progressent vers les systèmes limbiques, notamment dans l'hippocampe ; enfin les stades V et VI sont dits « stades isocorticaux » car dans ces derniers, les DNF envahissent l'ensemble du cortex (**Figure 10**) (Braak and Braak, 1997 ; Delacourte et al., 1999). De plus, il a été montré qu'il existait une corrélation entre l'évolution spatio-temporelle des DNF et les signes cliniques observés dans la maladie d'Alzheimer (Arriagada et al., 1992 ; Duyckaerts et al., 1997).

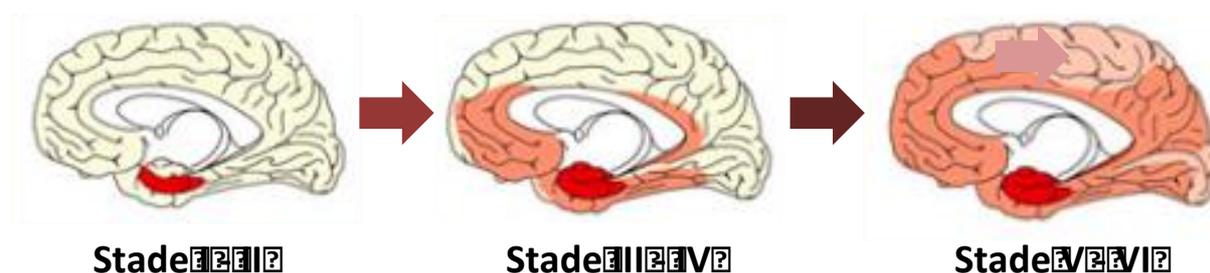


Figure 10 – Progression de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) dans la maladie d'Alzheimer selon Braak. L'apparition des DNF progresse de manière spatio-temporelle, dans les stades I – II elles apparaissent dans le cortex transentorinal puis envahissent la CA1 de l'hippocampe. Dans les stades III – IV elles progressent dans la totalité de l'hippocampe et les aires associatives, pour finir dans les stades V – VI à atteindre l'ensemble du cortex. (Adaptée de Braak and Tredici, 2011).

Depuis ces dernières années, beaucoup d'études ont focalisé sur le phénomène de « propagation de la pathologie Tau », en effet, ces études pourraient expliquer l'évolution spatio-temporelle de la DNF. Aujourd'hui, l'hypothèse majeure serait que la progression de la DNF suivrait un processus comparable à celui de la protéine prion mal conformée PrP^{SC}, un agent infectieux retrouvé dans la maladie de Creutzfeldt Jakob (pour revue Prusiner, 1986). Il a notamment été montré que les protéines prion PrP^{SC} étaient capables de transformer les protéines prion normales (PrP^C), et que ces protéines malconformées possédaient la capacité de se transférer de cellule à cellule afin de répandre la pathologie dans différentes régions cérébrales (pour revue Prusiner, 2013 ; Aguzzi and Calella, 2009). Concernant la propagation de la pathologie Tau, en 2009, une équipe a montré que l'injection intracérébrale d'extraits cérébraux murins

contenant des DNF dans des animaux sauvages ou surexprimant une protéine Tau humaine entraînait la naissance d'une pathologie Tau au site d'injection (Clavaguera et al., 2009). De plus, il a été observé que ces protéines Tau pathologiques étaient capables de recruter les protéines Tau physiologiques et de les convertir tout comme cela est décrit pour la protéine prion (de Calignon et al., 2012). De la même manière, l'injection cérébrale de vecteurs lentiviraux codant pour une protéine Tau humaine sauvage et mutée, a montré que la pathologie Tau était visible au site d'injection mais également dans des régions plus éloignées (Dujardin et al., 2014a). Aujourd'hui le mode de transmission de la pathologie Tau n'est pas franchement établi, mais il est connu que cette propagation est possible par la transmission des DNF entre les neurones (Mohamed et al., 2013). Plusieurs travaux tendent à décrire une transmission intercellulaire possible via les nanotubes (Tardivel et al., 2016), les ectosomes (Dujardin et al., 2014b), les exosomes (Simòn et al., 2012) et de manière libre. Ainsi, le mécanisme d'évolution spatio-temporelle de la DNF commence à être de plus en plus compris même si de nombreuses hypothèses restent à confirmer.

B.1.b.6. Relation entre les deux lésions neuropathologiques

A ce jour, deux questions majeures restent toujours en suspens : Quelle est la lésion précurseur de la maladie ? La lésion initiatrice entraîne-t-elle l'apparition de la seconde lésion ? Temporellement, il est montré que les DNF apparaissent avant les plaques amyloïdes (Braak and Del Tredici, 2004), et selon des observations aucun patient Alzheimer ne présente de plaques amyloïdes sans DNF (Braak et al., 2011). De plus, il n'y a que les DNF qui montrent une évolution spatio-temporelle qui est corrélée au déclin cognitif (Giannakopoulos et al., 2003). A l'inverse d'autres études mettent en avant l'émergence de la « cascade amyloïde », en postulant que les plaques amyloïdes sont le point d'ancrage de la maladie d'Alzheimer (Hardy and Higgins, 1992). On pourrait également émettre l'hypothèse que ces deux lésions neuropathologiques agissent ensemble, même si l'une est localisée en extracellulaire et l'autre en intracellulaire. En effet, des études ont montré que ces deux lésions étaient

retrouvées au niveau de la synapse, et pourraient agir en synergie dans la perte synaptique rencontrée dans la maladie d'Alzheimer (Spires-Jones and Hyman, 2014). Beaucoup d'études cherchent à savoir si le peptide A β potentialise la pathologie Tau ou à l'inverse si Tau est nécessaire pour médier la toxicité A β (pour revue, Bloom, 2014).

B.1.b.7. Traitements et stratégies thérapeutiques en cours

Les traitements actuellement disponibles ne permettent pas de guérir de la maladie d'Alzheimer ; ils sont symptomatiques et non curatifs ; ils permettent de ralentir la régression du patient mais en aucun cas ils n'empêchent la mort neuronale ou la progression de la pathologie. Concernant les traitements médicamenteux, deux catégories sont administrées : les inhibiteurs d'acétylcholinestérase (Donepezil®, Galantamine® et Rivastigmine®) qui ont pour but de maintenir un taux élevé d'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans la transmission des messages nerveux ; et la Mémantine® qui est un antagoniste des récepteurs glutamatergiques, notamment du récepteur NMDA, cette molécule a pour but de diminuer les taux en glutamate. Ces traitements symptomatiques ont été élaborés suite à des observations chez des patients Alzheimer qui possédaient un taux d'acétylcholine fortement diminué et un taux de glutamate élevé (pour revue, Mann and Yates, 1986).

A la vue du manque de traitements curatifs, les études se sont focalisées sur le développement de stratégies thérapeutiques. Dans un premier temps, des thérapies anti-amyloïde visent des cibles directes comme le peptide A β par des approches d'immunisation utilisant des anticorps dirigés contre des formes solubles et insolubles dans le but d'augmenter la clairance des plaques amyloïdes. Elles visent aussi des cibles indirectes comme les enzymes responsables de la génération du peptide A β (β -sécrétase et γ -sécrétase) par des inhibiteurs pharmacologiques (pour revue, Briggs et al., 2016). Dans un second temps, des thérapies anti-Tau sont également en cours par des approches d'immunisation également utilisant des anticorps dirigés contre différentes formes de Tau ainsi que des molécules visant à inhiber les acteurs

impliqués dans la phosphorylation de Tau et visant à activer les voies de dégradation (pour revue, Mendiola-Precoma et al., 2016 ; Wang and Mandelkow, 2016). En effet, par la technique d'immunothérapie passive, le premier anticorps testé avait pour cible la protéine Tau phosphorylée en Ser422, mais après la phase clinique 1, le projet a été arrêté (Panza et al., 2016). Ces thérapies ont ainsi pour but de dégrader les espèces pathologiques de Tau et/ou d'empêcher leur propagation. Ces quelques exemples appartiennent à une longue liste de stratégies thérapeutiques en développement.

Pour conclure, la protéine Tau s'inscrit dans un groupe de pathologies neurodégénératives ; les Tauopathies qui montrent de nombreuses hétérogénéités encore aujourd'hui non expliquées. En effet, les mécanismes conduisant aux lésions histopathologiques observées dans ces pathologies comme les DNF, ne sont pas encore élucidés, du fait de l'influence de nombreux facteurs. De plus, dans la maladie d'Alzheimer il y a un lien probable entre les plaques amyloïdes et les DNF.

Chapitre 2 : Les modifications post-traductionnelles de la protéine Tau et leur implications physiologiques et pathologiques

Les modifications post-traductionnelles ont lieu après la synthèse protéique, elles correspondent à des modifications chimiques qui vont affecter la l'activité, la fonction, la demi-vie ou la localisation cellulaire de la protéine cible. La protéine Tau est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles : la phosphorylation, la glycosylation, la nitration, l'acétylation, l'ubiquitinylation, la méthylation, l'isomérisation, la O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAc), la glycation, et la troncation (pour revue, Mietelska-Porowska et al., 2014). Parmi ces modifications, la phosphorylation est largement la plus étudiée et caractérisée, elle joue un rôle aussi bien physiologique que pathologique. Alors que la nitration et la O-GlcNAc n'ont été décrites qu'en condition physiologique, la glycation et la troncation n'ont été décrites qu'en condition pathologique. A défaut d'être exhaustif, nous focaliserons principalement sur la phosphorylation et sur la troncation et évoquerons brièvement les autres modifications post-traductionnelles retrouvées sur Tau.

A. La phosphorylation de la protéine Tau

Elle correspond à l'ajout d'un groupement phosphate provenant d'une molécule d'ATP sur le groupement hydroxyle libre de la chaîne latérale des acides aminés ; Sérine (Ser), Thréonine (Thr) ou Tyrosine (Tyr). Cette réaction est catalysée par un groupe d'enzymes appelées kinases, alors que la réaction de déphosphorylation est réalisée par les phosphatases. Ainsi, la phosphorylation apparaît comme une modification dynamique et réversible. C'est la modification majoritaire sur Tau, puisque Tau possède 85 sites potentiellement phosphorylables sur l'isoforme la plus longue (2N4R), cela représente 20% de la protéine totale (Butler and Shelanski, 1986).

A.1. Les kinases et phosphatases agissant sur la protéine Tau

A la vue des nombreux sites phosphorylables présents sur Tau, une vingtaine de kinases ont été identifiées en ayant pour cible Tau. Elles sont réparties en trois familles, selon les motifs de reconnaissance qu'elles phosphorylent. Ainsi, on distingue : les kinases « *Proline Directed Protein Kinases* » (PDPK) qui phosphorylent les résidus Ser et Thr suivis d'un résidu proline (Pro) ; les kinases non-PDPK qui phosphorylent les Ser et Thr non suivis d'un résidu Pro et les kinases spécifiques des Tyr (Tyr kinases) (Sergeant et al., 2008). On peut notamment citer la « *Glycogen Synthase Kinase 3 β* » (GSK3 β) qui est l'une des kinases majeures de Tau (LLorens-Martin et al., 2014) et la « *Cyclin-Dependent-Like Kinase-5* » (CDK5) qui appartiennent à la famille PDPK. Alors que la « *Calcium/Calmodulin-Activated Protein Kinase II* » (CaMKII) et la « *Protein Kinase A* » (PKA) appartiennent à la famille non-PDPK.

A l'inverse de la phosphorylation, la déphosphorylation de Tau est assurée par différentes phosphatases, notamment les « *Protein Phosphatase* » PP1, PP2A, PP2B et PP5 (Liu et al., 2005). Il a notamment été montré que PP2A était responsable de 71% de l'activité phosphatase dans le tissu cérébral humain. Ainsi, PP2A serait la phosphatase majeure responsable de la déphosphorylation de Tau (Martin et al., 2013).

A.2. La phosphorylation, régulatrice des fonctions de Tau

Ce sont les travaux de Cleveland en 1977 qui montrent que Tau peut être phosphorylée (Cleveland et al., 1977b). A la suite de cette découverte, de nombreuses études se sont focalisées sur le rôle que peut jouer la phosphorylation sur les fonctions de Tau.

Les premières études ont montré que sous sa forme déphosphorylée, la protéine Tau permet une meilleure polymérisation de la tubuline en microtubules (Lindwall and Cole, 1984). Par la suite et grâce au développement d'outils immunologiques spécifiquement dirigés contre différents sites de phosphorylation, les sites de phosphorylation de Tau impliqués dans la liaison aux microtubules ont pu être

identifiés. En effet, la phosphorylation des résidus Ser262, Ser293, Ser324 et Ser356 localisés dans les motifs répétés entraîne une rupture de la liaison de Tau avec les microtubules (Biernat et al., 1993 ; Drewes et al, 1995 ; 1997, Fischer et al., 2009). De même que pour les résidus Thr231 et Ser235 localisés dans le domaine riche en Proline, qui lorsqu'ils sont phosphorylés entraînent une diminution de l'affinité de Tau pour les microtubules (Sengupta et al., 1998 ; Cho and Johnson, 2004). Par ailleurs, ces travaux, montrent l'importance du domaine riche en Proline de Tau dans la régulation de sa liaison aux microtubules (**Figure 11**).

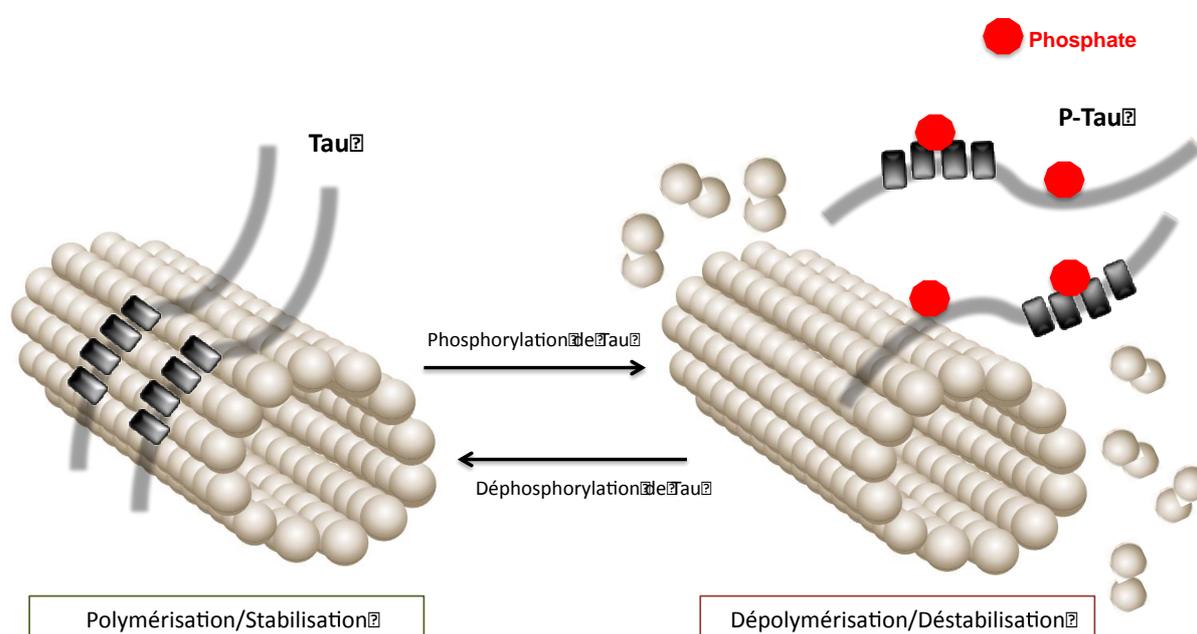


Figure 11 – Régulation de la dynamique microtubulaire via la protéine Tau. La liaison de Tau sur les microtubules via les motifs répétés permet une stabilisation des microtubules à l'inverse le détachement de Tau par sa phosphorylation conduit à une dépolymérisation. Ici, sont représenté les phosphorylations des résidus Ser262 et Ser396, deux sites majeurs localisés dans le domaine riche en Proline et les motifs répétés.

En plus de son implication dans la régulation de la dynamique microtubulaire, la phosphorylation de Tau module également d'autres fonctions. En effet, il a été montré que la phosphorylation de Tau modulait le transport axonal, des études montrent que l'augmentation de la phosphorylation de Tau par la kinase GSK3 entraîne un meilleur transport des vésicules le long des microtubules (Spittaels et al., 2000 ; Mudher et al., 2004). De plus, la phosphorylation de Tau peut également

impacter sa liaison avec des partenaires protéiques, notamment avec certaines protéines contenant des domaines SH3, telles que Fyn (Reynolds et al., 2008). Concernant la localisation subcellulaire de Tau, elle est elle-même régulée par la phosphorylation ; en étant dans un stade déphosphorylé, Tau est associée à la membrane plasmique (Arrasate et al., 2000). A l'inverse lors de l'utilisation d'inhibiteur de phosphatases, Tau devient alors hyperphosphorylée et délocalisée de la membrane plasmique (Maas et al., 2000). De même, la protéine Tau a été localisée dans le compartiment nucléaire par l'utilisation de l'anticorps Tau1 reconnaissant la protéine Tau déphosphorylée sur les Ser 195, 198, 199 et 202 (Loomis et al., 1990 ; Szendrei et al., 1993).

A.3. La phosphorylation de Tau dérégulée dans la maladie d'Alzheimer

Comme décrit précédemment, dans les Tauopathies ; incluant la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau est retrouvée anormalement phosphorylée et hyperphosphorylée. En effet, des études ont montré des différences du niveau de phosphorylation entre les protéines Tau extraites de cerveau provenant de sujets contrôles et de patients Alzheimer. Au sein des PHFs extraits des patients Alzheimer, Tau possède un niveau de phosphorylation 2 à 3 fois plus élevé que chez les sujets contrôles (Köpke et al., 1993 ; Ksiezak-Riefing et al., 1992). Une approximation du nombre de sites phosphorylés a également été déterminée grâce aux outils immunologiques et la spectrométrie de masse ; contre 9 sites phosphorylés identifiés dans les cerveaux de sujets contrôles, environ 40 sites phosphorylés ont été identifiés dans les cerveaux de patients Alzheimer (Hanger et al., 1998 ; Morishima-Kawashima et al., 1995) (**Figure 12**). Ces données sont critiquables et sous-estiment le niveau de phosphorylation retrouvé dans les cerveaux de sujets contrôles. En effet, ces études ont été réalisées sur des tissus provenant d'autopsies et malheureusement, la phosphorylation n'est pas une modification post-traductionnelle stable. Au cours du délai *post-mortem*, la phosphorylation de novo n'est pas possible à cause du manque d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). En revanche, les phosphatases sont actives et

entraînent une déphosphorylation des formes solubles de Tau au contraire des formes agrégées qui ne sont pas accessibles (Gong et al., 1995 ; Yamamoto et al., 1995).

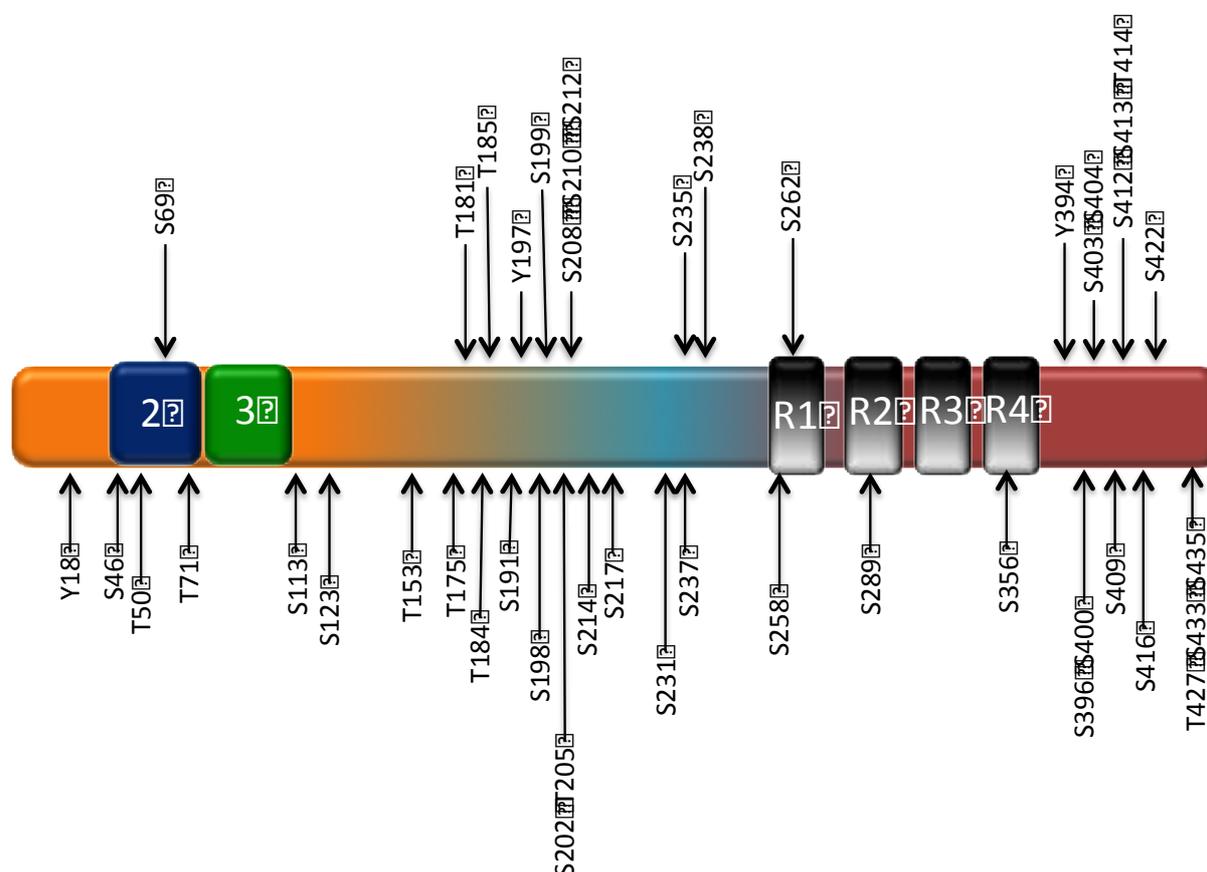


Figure 12 – Localisation des sites de phosphorylation de la protéine Tau provenant de cerveau de patients Alzheimer. Il y a environ 45 sites de phosphorylation sur des résidus Tyrosine (Y), Serine(S) et Thréonine (T) qui ont été identifiés. Ces sites sont majoritairement localisés dans le domaine riche en Proline (adapté de Noble et al., 2013).

Par le développement d'outils immunologiques, des études ont mis en évidence des épitopes très phosphorylés sur les protéines Tau pathologiques en comparaison aux protéines Tau physiologiques : AT8 (Ser199, 202 et Thr205) (Mercken et al., 1992 ; Porzig et al., 2007), AT270 (Thr181), AT180 (Thr231) (Goedert et al., 1994), PHF-1 (Ser396, 404) (Condamines et al., 1995 ; Otvos et al., 1994), 12E8 (Ser262) (Seubert et al., 1995). D'autres outils immunologiques ciblent uniquement des protéines Tau pathologiques, dont les épitopes phosphorylés n'ont été retrouvés que dans les

cerveaux de patients Alzheimer : AT100 (Hoffman et al., 1997) et TG3 (Jicha et al., 1997b). De manière intéressante, il a été montré que le profil de phosphorylation de Tau corrélait avec la perte d'intégrité neuronale et la formation des DNF. En effet, les épitopes reconnus par TG3 et 12E8 apparaissent précocement dans la formation de la DNF alors que les épitopes reconnus par AT8 et PHF-1 apparaissent tardivement (Augustinack et al., 2002). En plus de ces anticorps reconnaissant des formes phosphorylées de Tau, les outils immunologiques MC1 ou Alz50 sont dirigés contre des modifications conformationnelles de Tau qui ne sont détectées que dans la maladie d'Alzheimer (Carmel et al., 1996 ; Jicha et al., 1997a). Par exemple, l'anticorps Alz50 reconnaît une conformation où les acides aminés 5-9 et 313-322 interagissent entre eux.

La question qui se pose est quelle est la cause de cette hyperphosphorylation et phosphorylation anormale ? Il apparaît comme une évidence, que cela provient d'un déséquilibre entre les kinases et phosphatases de Tau. En effet, dans des modèles *in vivo* de surexpression de la GSK3 β , il a été observé une hyperphosphorylation de Tau associée avec un déficit cognitif (Hernandez et al., 2002). A contrario, dans des modèles *in vivo* de Tauopathies, l'inhibition de GSK3 β par injection intra-péritonéale de lithium permet de diminuer le niveau de phosphorylation de Tau et cela conduit à une diminution des neurones en DNF (Caccamo et al., 2007 ; Engel et al., 2006). De plus, la surexpression de CDK5 *in vivo* conduit également à une hyperphosphorylation de Tau et la formation de DNF dans le cortex et l'hippocampe (Cruz et al., 2003). L'analyse de tissus cérébraux provenant de patients Alzheimer a montré que les kinases CDK5 et GSK3 β co-localisent avec les DNF (Yamaguchi et al., 1996). Cependant l'altération de l'expression et de l'activité de ces kinases est encore très controversée dans le tissu cérébral provenant de patients Alzheimer (Leroy et al., 2007a ; Tandon et al., 2003). Concernant les phosphatases, et notamment, la principale phosphatase de Tau, PP2A a une activité diminuée d'environ 30% dans le cerveau de patients Alzheimer (Gong et al., 1993 ; 1995).

B. Les autres modifications post-traductionnelles de Tau : aperçu général

B.1. La O-N-Acetylglucosaminylation (O-GlcNAc)

Elle correspond à l'ajout d'un groupement N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le groupement hydroxyle d'une Ser ou Thr à partir de l'Uridine DiPhospho-GlcNAc (UDP-GlcNAc). Cette réaction réversible est catalysée par la O-N-Acetylglucosaminyltransférase (OGT) (Torres and Hart, 1984). La mise en évidence de cette modification post-traductionnelle sur Tau a été réalisée à l'aide de lectines (protéines qui se lient sur les glucides) qui se fixent sur les résidus O-GlcNAcylés. Ainsi, des protéines Tau O-GlcNAcylées ont été mises en évidence dans le cerveau bovin (Arnold et al., 1996) et humain (Liu et al., 2004). Concernant le rôle de cette modification sur Tau, il n'est aujourd'hui pas déterminé mais des études *in vitro* ont montré que les Ser356 (Yu et al., 2008a) et Ser400 (Yuzwa et al., 2012) O-GlcNAcylées de Tau ralentissaient l'agrégation de Tau en comparaison avec la phosphorylation. De plus, une inhibition dans des lignées cellulaires de la N-acétyl- β -D glucosaminidase (OGA) qui permet de retirer les groupements GlcNAc, entraîne une diminution de la phosphorylation de certains résidus de Tau (Liu et al., 2004 ; Yuzwa et al., 2008). De plus, les protéines Tau O-GlcNAcylée n'ont pas été détectées dans les PHF (Ledesma et al., 1994). Il a même été observé une baisse de cette modification de manière générale dans la maladie d'Alzheimer (Liu et al., 2009a). Du fait que cette modification ait pour cible les mêmes acides aminés que la phosphorylation, elles sont toutes les deux exclusives et la O-GlcNAc semble plutôt protectrice et non pathologique dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

B.2. La nitration

La nitration correspond à l'ajout d'un ou plusieurs groupements nitro NO₂ sur les Tyr pour former la 3-nitro tyrosine. Cette modification post-traductionnelle augmente au cours du vieillissement et a été retrouvée dans les neurones en DNF suggérant un rôle pathologique (Horiguchi et al., 2003). *In vitro*, la nitration se produit sur les Tyr18, 29, 197 et 394 de Tau (Reynolds et al., 2005 ; 2006a), de plus la

présence de ces Tyr modifiées a été validée dans le tissu cérébral grâce au développement d'outils immunologiques (Reynolds et al., 2006b). Concernant le rôle de la nitration sur Tau, elle favoriserait son agrégation (Zhang et al., 2005b) et entraînerait une diminution de sa liaison aux microtubules tout comme la phosphorylation (Reynolds et al., 2006a).

B.3. L'acétylation

Aussi nommée ϵ -acétylation, elle correspond à l'ajout d'un groupement acétyl à partir de l'Acétyl-CoenzymeA (Ac-CoA) sur la chaîne latérale des lysines (Lys) grâce aux enzymes dénommées acétyltransférases. Cette modification est réversible, en effet, les désacétylases permettent de retirer le groupement acétylé (pour revue, Drazic et al., 2016). Des études ont montré que l'incubation de Tau avec de l'Ac-CoA et une acétyltransférase conduisait à l'acétylation des Lys163, 174 et 180 (Min et al., 2010). De plus, la Lys174 et 280 ont également été retrouvées acétylées dans différentes Tauopathies dont la maladie d'Alzheimer et les DFTP-17 (Cohen et al., 2011a ; Irwin et al., 2012 ; Min et al., 2015). Il a été montré que l'acétylation de Tau sur la Lys280 diminue son affinité pour les microtubules et favorisait son agrégation (Cohen et al., 2001a ; Trzeciakiewicz et al., 2016). A l'inverse, une étude a montré que l'acétylation de certains motifs KXGS localisés dans les motifs répétés de Tau empêche la phosphorylation de ces sites et par conséquent l'agrégation de Tau (Cook et al., 2014). Concernant les enzymes responsables de l'acétylation de Tau, elles ne sont pas connues aujourd'hui mais il a été observé *in vivo* et *in cellulo* la déacétylation de Tau en présence de l'Histone Déacétylase6 (HDAC6) et la Sirtuine1 (Cook et al., 2004 ; Min et al., 2010).

B.4. L'ubiquitylation

C'est une modification post-traductionnelle complexe qui consiste en l'ajout de plusieurs résidus ubiquitine. Elle fait intervenir trois classes d'enzymes de manière

successive : l'enzyme E1 recrute l'ubiquitine, l'E2 transfère l'ubiquitine entre E1 et E3 ; et E3 ajoute l'ubiquitine sur la protéine cible. Ainsi, les protéines poly-ubiquitinylées sont prises en charge par l'*Ubiquitin Proteasome System* (UPS), système majoritaire de dégradation des protéines mal conformées ou endommagées. C'est en 1987 que l'ubiquitine est retrouvée au sein des PHFs (Mori et al., 1987), par la suite les sites ubiquitinylés de Tau ont été identifiés : plusieurs Lys localisées dans le domaine de liaison aux microtubules (Cripps et al., 2006 ; Morishima-Kawashima et al., 1993). Certaines Lys ne sont retrouvées que monoubiquitinylées, ce qui empêche ainsi la dégradation potentielle de Tau.

La protéine Tau est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles, la majoritaire étant la phosphorylation ; elle est souvent décrite sous le terme de « phosphoprotéine ». Il existe une réelle coopération entre les différentes modifications post-traductionnelles pour assurer la fonction de Tau ou au contraire induire son caractère pathologique. Nous focaliserons par la suite sur la troncation de Tau qui est aujourd'hui une modification post-traductionnelle nouvellement étudiée.

C. La troncation, une modification post-traductionnelle récemment étudiée

C.1. Définition générale de la troncation

La troncation se définit comme une protéolyse partielle générant des intermédiaires protéiques détectables et fonctionnelles, selon la protéine ciblée. Cette modification post-traductionnelle fait intervenir une classe d'enzymes protéolytiques aussi appelées protéases ou peptidases. Il en existe plusieurs catégories en fonction de leur mécanisme d'action, et elles interviennent dans de nombreuses fonctions biologiques : maturation des protéines, digestion alimentaire, coagulation sanguine, etc. De plus, cette modification peut également faire intervenir non pas des enzymes mais un site de traduction alternatif, cela a notamment été décrit pour le facteur de transcription p53 (Solomon et al., 2014).

C.2. La troncation de la protéine Tau, lien avec les Tauopathies

L'étude de cette modification post-traductionnelle de Tau a débutée lors de l'observation au sein de PHFs isolés de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de formes tronquées dans leurs domaines amino- et carboxy-terminaux (Wischick et al., 1988). Cette découverte suggérait donc un potentiel rôle de la troncation dans la pathologie Tau, notamment sur l'agrégation de Tau et la neurodégénérescence (Wang et al., 2010a). De plus, la présence de formes tronquées chez les patients Alzheimer a été également mise en évidence dans le LCR des patients (Verheecke, 1975). Par ailleurs, des formes tronquées de Tau ont également été retrouvées dans le cerveau de patients atteints de PSP, DCB et DFTP-17 (Arai et al., 2004 ; Corsetti et al., 2008). Aujourd'hui l'identification de toutes les formes tronquées de Tau n'est pas élucidée, de nombreuses hypothèses restent en suspens et la troncation est surtout décrite dans un contexte pathologique de protéinopathies.

C.2.a. Les formes tronquées de Tau dans la partie carboxy-terminale identifiées dans la maladie d'Alzheimer

L'analyse des protéines Tau à partir du tissu cérébral de patients atteints de la maladie d'Alzheimer par électrophorèse monodimensionnelle montre un profil hétérogène caractéristique. En effet, la phosphorylation anormale, l'hyperphosphorylation, l'agrégation et la troncation de Tau sont à l'origine de la détection de protéines Tau de hauts et bas poids moléculaires en plus du triplet caractéristique des différentes isoformes de Tau sous forme de monomères (Kovacech and Novak, 2010 ; Zilka et al., 2012). A ce jour, deux formes tronquées dans le domaine carboxy-terminal ont bien été étudiées : la forme tronquée se terminant par le Glutamate 391 (Glu391 ou E391) et celle se terminant par l'Aspartate 421 (Asp421 ou D421) ; de nombreuses autres ont été identifiées mais ne sont pas totalement caractérisées.

C.2.a.1. Découverte inattendue de la forme tronquée se terminant par le résidu E391

La découverte de cette forme tronquée a été réalisée plutôt par hasard, en effet, les travaux de Mr Wischick et Mr Novak avaient pour but de déterminer la composition des PHFs qui est très hétérogène et ainsi déterminer le domaine minimal qui constitue les PHFs. Pour cela, ils ont mis au point une expérience basée sur la digestion enzymatique des PHFs à la pronase qui permet de dégrader les protéines situées sur les extérieurs des PHFs et de conserver les protéines situées au cœur des PHFs : le PHF « *core* » qui est résistant à la pronase (Wischick et al., 1988a ; Wischick and Novak, 1988). Après avoir isolé ce PHF « *core* », l'analyse de celui-ci par électrophorèse monodimensionnelle révéla la présence de protéines de faibles poids moléculaires. Par la suite, un séquençage des espèces majoritaires du PHF « *core* » a été réalisé, les résultats ont permis d'isoler des séquences peptidiques qui ont ensuite été utilisées pour générer des sondes oligonucléotidiques. Ces sondes ont été utilisées sur une banque d'ADNc extraits de cerveaux humains dans le but d'obtenir la composition du PHF « *core* ». Les résultats ont montré que les sondes ciblaient l'ADNc de Tau, notamment après examen, le peptide VQIVYKP situé dans le troisième motif répété (Goedert et al., 1988). Ainsi le PHF « *core* » contient bien une séquence peptidique de la protéine Tau.

Afin de caractériser au mieux ce PHF « *core* », le développement d'outils immunologiques a été réalisé, notamment l'anticorps monoclonal mAB423 ciblant le troisième domaine de liaison aux microtubules de Tau (Novak et al., 1989). L'utilisation de cet outil en microscopie électronique et à de faibles concentrations permet de détecter les PHFs digérés à la pronase mais pas les PHFs natifs qui ne sont détectés que lors de l'utilisation de fortes concentrations de l'anticorps. De plus, l'utilisation d'autres anti-Tau ne marquent que les PHFs natifs et non digérés à la pronase, ceci suggère que l'anticorps mAB423 marque un épitope différent des anti-Tau (Wischick et al., 1988). A la vue de ces données, un modèle de la distribution de Tau au sein des PHFs a été proposé : le PHF « *core* » est constitué des motifs répétés dont le peptide VQIVYKP et les extrémités des PHFs contiennent les extrémités

amino- et carboxy-terminales de Tau (Ksiezak-Reding and Yen, 1991 ; Jakes et al., 1991) (**Figure 13**). De plus, lors d'un traitement à la phosphatase alcaline, l'anticorps mAB423 détecte toujours le PHF « *core* » suggérant ainsi que celui-ci est dans un état non phosphorylé ou inaccessible à la phosphatase (Novak et al., 1991). Dans un dernier temps, l'épitope reconnu par l'anticorps mAB423 a été identifié, pour cela des mutants de délétion de la région d'ADN codant pour les motifs répétés ont été clonés dans des vecteurs d'expression procaryotes. Après production et purification des protéines recombinantes, l'analyse par immunoempreinte avec l'anticorps mAB423 a montré que celui-ci ne détecte que les séquences peptidiques se terminant par le résidu E391 (numérotation basée sur l'isoforme la plus longue de Tau : Tau2N4R) (Novak et al., 1993).

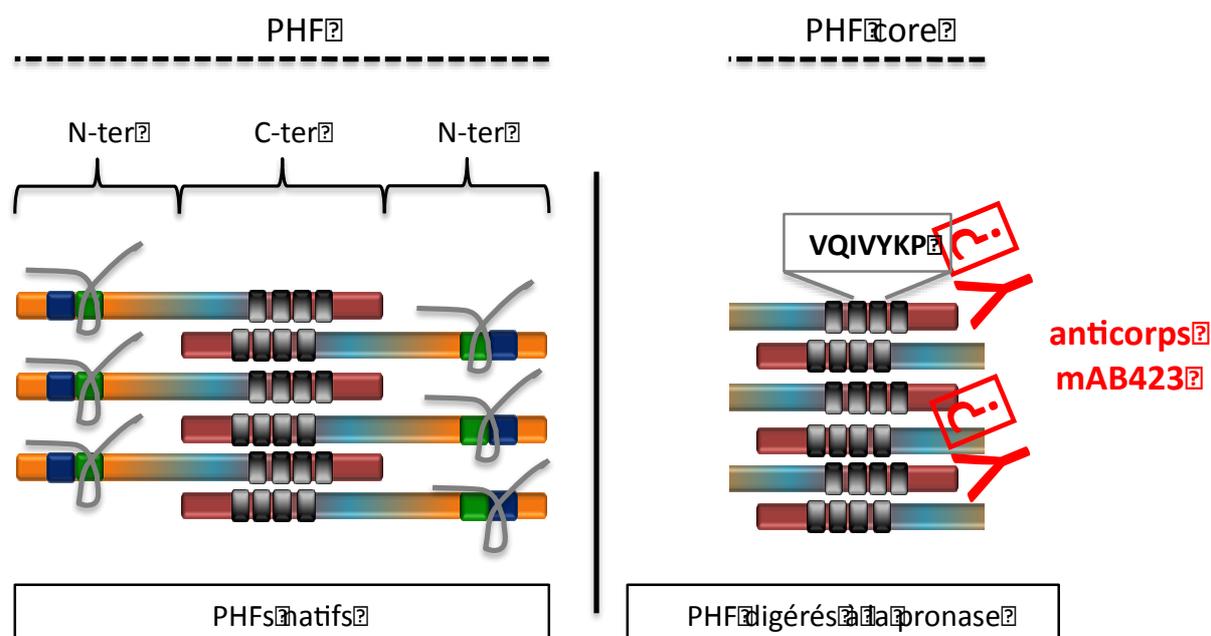


Figure 13 – Représentation schématique de la structure des PHFs natifs et digérés à la pronase. Les PHFs (Paired Helical Filaments) sont majoritairement composés de la protéine Tau. Cette dernière adopte une organisation particulière où les domaines amino-terminaux sont digérés vers l'extérieur du PHF. Après digestion à la pronase, le PHF core se compose surtout du domaine carboxy-terminal et l'épitope mAB423 reconnaissant la forme tronquée se terminant par le résidu Glu391 (E391) est mis en évidence.

C.2.a.2. La forme tronquée se terminant par le résidu D421

Après l'observation au sein des neurones en dégénérescence neurofibrillaire de nombreux marqueurs d'activité apoptotique, des études ont été débutées afin d'observer l'effet de l'apoptose sur la protéine Tau (Dickson et al., 2004). En effet, une étude a montré la présence de formes tronquées de Tau dans des neurones présentant une fragmentation de l'ADN (Ugolini et al., 1997). Par la suite et à l'aide de culture primaire de cervelet de rat, il a été observé que Tau était un potentiel substrat de certaines protéases telles que les caspases, en condition apoptotique. L'action de ces enzymes sur Tau entraînait la génération d'une forme tronquée de faible poids moléculaire d'environ 17kDa (Canu et al., 1998). De plus, ces travaux ont également montré que cette forme tronquée n'était plus capable de lier les microtubules. Afin de déterminer les enzymes protéolytiques impliquées dans ce clivage de Tau, des cultures primaires corticales de rat ont été traitées avec des fibrilles de peptide A β dans le but d'induire l'activation des caspases. Ces travaux ont montré que la génération de cette forme tronquée était dépendante de l'activation de la caspase 3 (Gamblin et al., 2003b). Par connaissance du site consensus reconnu par la caspase 3 (DXXD) et du profil électrophorétique de cette forme tronquée, il a été déterminé que la troncation avait lieu dans la partie carboxy-terminale, notamment après le résidu D421. Afin de pouvoir réaliser au mieux l'étude de cette forme tronquée, un anticorps a été développé, dénommé TauC3. Cet anticorps a permis de mettre en évidence la production de la forme tronquée se terminant par le résidu D421 *in cellulo* et la présence de celle-ci dans le tissu cérébral provenant de patients Alzheimer (Gamblin et al., 2003b). Un autre anticorps ciblant cette même forme tronquée a été développé par une autre équipe, dénommé α - Δ Tau. Son utilisation a confirmé les résultats obtenus précédemment, et a montré que la forme tronquée en D421 pouvait être générée dans un modèle triple transgénique de Tauopathies (Rissman et al., 2004).

C.2.a.3. La forme tronquée se terminant par le résidu N358

Il a récemment été montré qu'une protéase lysosomiale (Asparagine endopeptidase) clive la protéine Tau dans sa partie carboxy-terminale, au niveau de deux résidus Asparagine : N255 et N358. De plus, le développement d'un anticorps dirigé contre la forme tronquée se terminant par le résidu N358 a montré que celle-ci est retrouvée dans le tissu cérébral de patients Alzheimer (Zhang et al., 2014).

C.2.b. Les formes tronquées de Tau dans la partie amino-terminale retrouvées dans la maladie d'Alzheimer

En plus des formes tronquées dans la partie carboxy-terminale, décrites ci-dessus, d'autres formes tronquées ont été détectées dans le tissu cérébral provenant de patients Alzheimer. L'utilisation d'outils immunologiques sur des coupes histologiques de cerveau Alzheimer a permis de mettre en évidence de nombreux sites de troncation présents au sein des agrégats de Tau (Dickson et al., 1992 ; Garcia-Sierra et al., 2003). Une étude a montré la présence d'une forme tronquée de Tau débutant par l'Asp25 dans l'hippocampe de patients Alzheimer, alors qu'elle n'était pas présente chez les témoins. Des études *in vitro* ont montré que cette forme tronquée était générée sous l'action de la caspase 3 tout comme la forme tronquée se terminant par l'Asp421 (Rohn et al., 2002). De plus, la forme tronquée débutant par l'Asp25 a également été identifiée dans des modèles cellulaires et des modèles *in vivo* de neurodégénérescence (Corsetti et al., 2008). Par ailleurs, il a également été observé *in vitro* la génération d'une forme tronquée débutant par l'Asp13, celle-ci est générée par la caspase 6 (Horowitz et al., 2006). Plus récemment, dans notre équipe, nous avons identifié par une approche protéomique de nombreuses formes tronquées délétées de leurs parties amino-terminales, à partir de tissus cérébraux provenant de patients Alzheimer (Derisbourg et al., 2015).

C.2.c. Les formes tronquées de Tau dans les autres Tauopathies

La majorité des études focalisant sur la troncation de Tau se sont déroulées dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, mais quelques études ont montré que les formes tronquées de Tau n'étaient pas restreintes à la maladie d'Alzheimer. En effet, lors de l'observation du profil électrophorétique de Tau dans différentes Tauopathies, différentes formes de Tau caractérisées par de faibles poids moléculaires sont présentes (**Figure 14**) (Hanger and Wray, 2010).

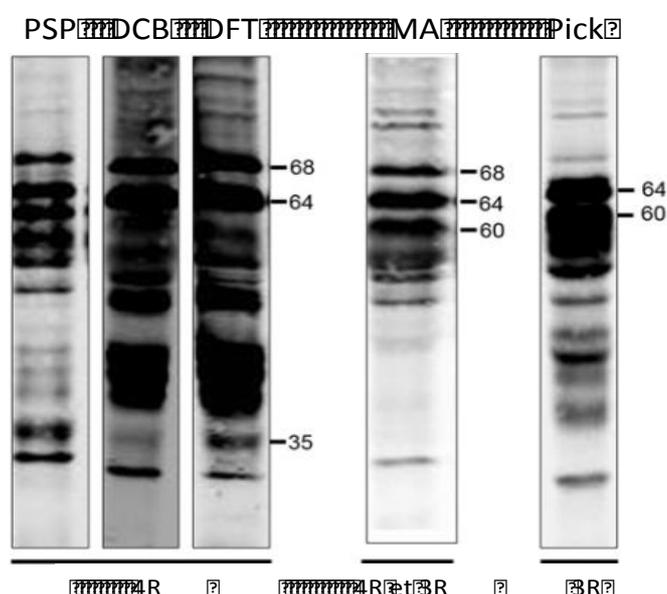


Figure 14 – Les formes tronquées de Tau dans les Tauopathies. La majorité des études sur la troncation de Tau se focalise sur la maladie d'Alzheimer. L'analyse par WB de tissus cérébraux en utilisant l'anticorps dirigé contre la partie carboxy-terminal de Tau d'autres Tauopathies a montré la présence de nombreuses formes tronquées. En effet, en plus d'être détecté dans la maladie d'Alzheimer, elles sont retrouvées dans la maladie de Pick, la paralysie supranucléaire (PSP), la dégénérescence cortico-basale (DCB) et les démences fronto-temporales (DFT). (Adaptée de Hanger and Wray, 2010).

Dans un premier temps, il était intéressant d'observer si les formes tronquées bien caractérisées et se terminant par les résidus E391 et D421 étaient présentes dans d'autres Tauopathies. Les résultats ont montré que ces deux formes tronquées étaient retrouvées dans la maladie de Pick, notamment au sein des corps de Pick qui correspondent à la lésion histologique contenant les agrégats de la protéine Tau

(Guillozet-Bongaarts et al., 2007 ; Mondragon-Rodriguez et al., 2008b). Dans la DCB et la PSP des formes tronquées dans la parité amino-terminale ont été identifiées, pour la DCB : une forme tronquée débutant par le résidu Thr169 et pour la PSP : une forme tronquée débutant par le résidu Glu187 (Arai et al., 2004). Ainsi, la présence de formes tronquées distinctes entre ces deux pathologies pourrait permettre de les dissocier à l'aide d'outils immunologiques. Enfin, une forme tronquée d'une masse moléculaire d'environ 17kDa a été retrouvée au sein du tissu cérébral de plusieurs Tauopathies (Ferreira and Bigio, 2011). En recouvrant différentes études *in cellulo* et avec le développement d'anticorps, il a été montré que cette forme tronquée était clivée dans la partie amino-terminale au résidu Ala125 et dans la partie carboxy-terminale au résidu Arg230 (Park and Ferreira, 2005). Parmi ces deux sites, le site de troncation Arg230 a été identifiée dans le tissu cérébral de différentes Tauopathies mais également dans le tissu cérébral de sujets témoins (Garg et al., 2011). Ainsi, la troncation avait été jusqu'ici décrite exclusivement dans un contexte pathologique (Figure 15).

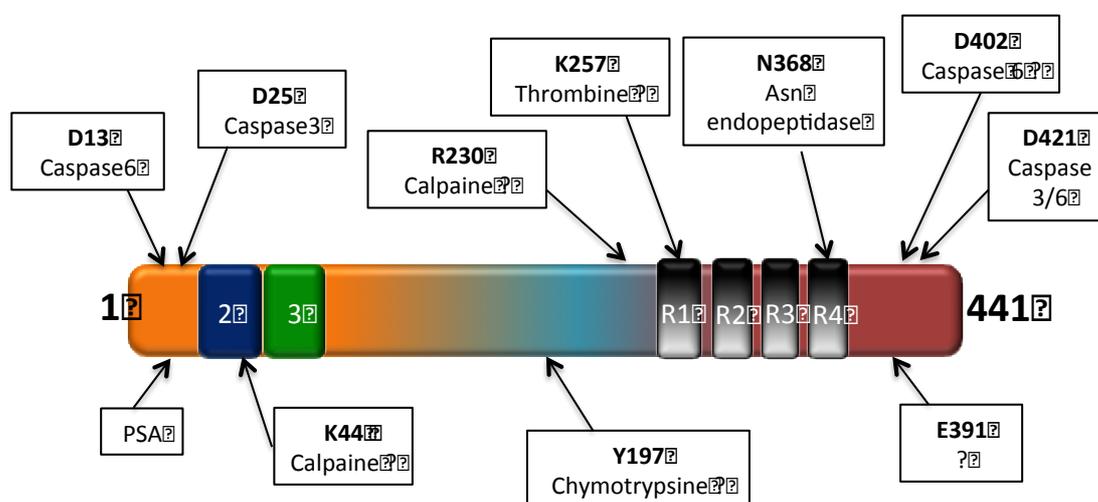


Figure 15 – Les sites de troncation identifiés sur la protéine Tau et leur mode de génération. Aujourd'hui toutes les formes tronquées et les acteurs responsables ne sont pas identifiés. De nombreuses formes tronquées sont générées par des caspases (D13, D25, D402 et D421), d'autres par des calpaïnes (K44, R230) et d'autres par des protéases telles que la chymotrypsine, l'asparagine endopeptidase, la thrombine. (Adaptée de Wang et al., 2010a).

C.3. Les formes tronquées retrouvées dans le liquide céphalo-rachidien

Le liquide céphalo-rachidien (LCR) correspond à un fluide biologique dans lequel baignent le cerveau et la moelle épinière, on le retrouve à l'extérieur et l'intérieur du système nerveux central grâce à sa circulation entre les ventricules cérébraux. Il permet de réguler les pressions exercées sur le cerveau, joue le rôle « d'amortisseur de chocs » et sert de fluide nourricier pour le tissu nerveux (sa composition étant proche de celle du plasma) (Zappaterra and Lehtinen, 2012). Comme décrit dans le premier chapitre, le LCR est aujourd'hui utilisé pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. En effet, la protéine Tau est retrouvée dans ce fluide biologique, de manière phosphorylée ou non aussi bien chez les sujets témoins que les patients Alzheimer (Belnow et al., 2012). Il avait également été observé une augmentation de la concentration en protéines Tau, notamment les formes phosphorylées, entre le LCR d'un sujet témoin et d'un patient Alzheimer, même si il faut noter que la concentration de Tau dans ce fluide est très faible, de l'ordre du picogramme. En plus de ces formes totales de Tau, une étude en 1997 a révélée la présence de formes tronquées de Tau dans le LCR de patients Alzheimer (Johnson et al., 1997). Par la suite, la caractérisation globale de ces formes tronquées a montré que dans le LCR les formes tronquées étaient majoritairement délétées de leurs parties amino-terminales (Amadoro et al., 2014). Aujourd'hui une forme tronquée se terminant par le résidu Asp402 et générée par la caspase 6 a été validée dans le LCR de patients Alzheimer (Ramcharitar et al., 2013). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer le potentiel des formes tronquées de Tau en tant que marqueurs de diagnostic. Par ailleurs, la composition très complexe du LCR et la concentration est très faible des protéines d'intérêt dans ce liquide nécessitent de développer des techniques de détection plus sensibles (Portelius et al., 2008).

C.4. La troncation : quelles conséquences sur les fonctions de Tau ?

A la vue des sites de troncation décrits précédemment, la troncation peut avoir lieu sur toute la protéine Tau et n'est pas restreinte à un domaine particulier, même si

elle a lieu majoritairement au niveau de la queue carboxy-terminale et du domaine amino-terminal (Kovacech and Novak, 2010). Par conséquent, chaque forme tronquée va posséder sa propre « signature biologique » et les conséquences fonctionnelles vont varier en fonction des domaines de Tau affectés. Actuellement, la troncation est globalement décrite dans un contexte pathologique, et on attribue aux formes tronquées de Tau une « étiquette plutôt toxique ».

C.4.a La troncation de Tau : gain de fonction toxique ?

L'agrégation de Tau n'est pas retrouvée en condition physiologique mais en condition pathologique, aujourd'hui beaucoup de controverses existent autour des espèces réellement toxiques de Tau : les dimères, les oligomères, les agrégats ? (Lasagna-Reeves et al., 2011).

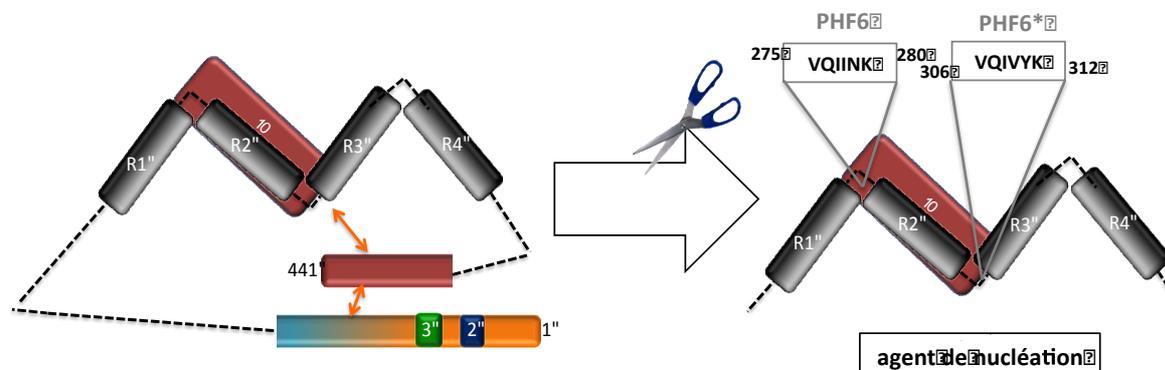


Figure 16 – Conséquence de la troncation sur la protéine Tau. Parmi les conséquences décrites lors de la troncation de Tau, des changements de conformation de Tau entraînent le démasquage des motifs pro-agrégatifs PHF6 et PHF6*. Ainsi, ces fragments particuliers pourraient servir d'agent de nucléation. (Adaptée de la thèse du Dr Derisbourg Maxime).

Comme décrit dans le premier chapitre, il est connu que les séquences de Tau $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ et $^{306}\text{VQIVYK}^{312}$ également appelées motifs pro-agrégatifs « PHF6 et PHF6* », localisées dans les motifs répétés sont sujets à la formation de structure en feuillets β (Mukrash et al., 2005). Ces structures étant un caractère commun des

protéines à pouvoir pro-agrégatif. Selon un modèle proposé, Tau adopte en condition physiologique une structure en forme de « thrombone » qui permettrait de masquer ces motifs pro-agrégatifs notamment avec le domaine carboxy-terminale (Jeganathan et al., 2006). A contrario, en condition pathologique, notamment lors de la troncation de la protéine Tau, ces motifs pro-agrégatifs seraient dévoilés et serviraient d'agent de nucléation pour l'agrégation de Tau (**Figure 16**).

Ces hypothèses ont été d'abord étudiées *in vitro*, grâce à l'utilisation de protéines Tau tronquées recombinantes démunies de leurs parties carboxy-terminales mais contenant les motifs PHF6 et PHF6*. Il a été montré que ces formes tronquées possédaient la capacité d'augmenter la vitesse de fibrillogenèse de Tau et entraînaient la formation d'agrégats incluant la protéine Tau entière (Abraha et al., 2000 ; Yin and Kuret, 2006). De plus, le fait que le domaine carboxy-terminale de Tau soit absent facilitait l'agrégation de la forme tronquée. Ainsi ce domaine aurait des propriétés anti-agrégatives (Berry et al., 2003). A la vue de ces résultats, la troncation jouerait bien un rôle pathologique notamment dans le processus de formation de la DNF. Cette modification post-traductionnelle intervient-elle dans les étapes de déclenchement de la DNF ? Beaucoup d'études ont été réalisées sur le tissu cérébral humain et à l'aide de modèles animaux transgéniques afin de répondre à cette question.

C.4.b. Implication de la troncation de Tau dans la formation de la DNF

De nombreuses études immunologiques ont observé la distribution cérébrale des formes tronquées D421 et E391, elles ont révélé une certaine apparition de ces espèces en comparaison avec l'apparition de la DNF. En effet, il a été proposé à partir de l'étude de coupes hippocampiques de patients Alzheimer un processus de développement de la DNF (Bondareff et al., 1994). Dans un premier temps, un changement de conformation de la protéine Tau aurait lieu la rendant pathologique et reconnu par l'épitope Alz50 (interaction entre les acides aminés 5-9 et 313-322). Ce changement de conformation serait suivi d'événements de troncation dans la partie carboxy-terminale, notamment du site D421 avant le site E391 (Binder et al., 2005 ;

Ces criblages immunologiques sur tissus cérébraux ont également permis de mettre en évidence une corrélation entre la présence des formes tronquées D421 et E391 et la DNF ainsi qu'avec les stades de Braak décrits dans le premier chapitre (Basurtos-Islas et al., 2008, Garcia-Sierra et al., 2001).

C.4.c. La troncation de Tau dans les domaines carboxy- et amino-terminaux : études dans les modèles animaux et cellulaires

Le développement de modèles murins transgéniques a permis l'étude de l'impact de la troncation de Tau sur la pathologie Tau. L'un des premiers modèles développés a été celui de Novak et ses collaborateurs, un rat surexprimant une forme tronquée dans la partie amino- et carboxy-terminale (t151-391) (Zilka et al., 2006). Ce modèle montre une DNF, avec une immunoréactivité pour des sites hyper- et anormalement phosphorylés de Tau ainsi que la présence de formes agrégées de Tau dans lesquelles on retrouve la Tau endogène et la forme tronquée t151-391. De plus au niveau fonctionnel, la forme tronquée t151-391 induit la formation d'un réseau microtubulaire anormal par rapport à la Tau entière. Toutes ces observations sont corrélées avec des troubles de la mémoire spatiale, conséquences des lésions présentes dans l'hippocampe et le cortex de ces animaux (Hrnkova et al., 2007). A la suite de cette étude, un modèle murin a été généré avec cette fois-ci la totalité de la forme tronquée (1-391), les observations histologiques et biochimiques étaient identiques au modèle précédent (hyper- et phosphorylation anormale, agrégats) (McMillan et al., 2011). En ce qui concerne l'autre forme tronquée bien caractérisée et se terminant par le résidu D421, un seul modèle animal a été généré par injection d'adénovirus codant pour la séquence 1-421 de Tau (de Calignon et al., 2010). Dans ce modèle, il a été observé une formation d'agrégats ce qui prouve que la présence de cette espèce de Tau est suffisante pour entraîner la pathologie Tau. Des études précédentes avaient montré que la forme tronquée se terminant par le résidu D421 était présente dans plusieurs modèles transgéniques de Tauopathies (Zhang et al., 2009a) et qu'elle était associée à la formation de la DNF (Zhang et al., 2009b). De plus, dans un modèle triple transgénique APP/PS1/Tau, il a été montré qu'il y avait une augmentation avec l'âge

de la malconformation de Tau et de la troncation de Tau en D421 (Héraud et al., 2013). D'autres études ont montré au contraire, que la forme tronquée se terminant en D421 était une conséquence de la pathologie, en effet dans le modèle Thy-Tau30 surexprimant une protéine Tau humaine mutée, cette espèce de Tau est détectée après la pathologie Tau (Leroy et al., 2007b). Ces études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que la délétion de la partie carboxy-terminale de Tau engendrait une tendance de Tau à former des filaments et également à recruter la protéine Tau entière dans ce processus.

En supplément des modèles transgéniques, l'étude de la troncation de Tau a été réalisée dans les modèles cellulaires. Une étude a montré que la forme tronquée débutant par le résidu Asp13 entrainerait une inhibition de la fibrillation de la protéine Tau entière (Horowitz et al., 2006). De plus, la délétion des 150 premiers acides aminés de Tau a été montrée comme ayant une incidence sur sa localisation subcellulaire. En effet, dans une lignée cellulaire de neuroblastome humain, la co-expression de la protéine Tau entière et t151-391 a montré que seule la forme tronquée t151-391 était capable d'être envoyée dans le compartiment nucléaire (Paholikova et al., 2015). De plus, la surexpression des formes tronquées 151-391 et 151-421 dans des cellules de fibroblastes et des cultures primaires entraînent une fragmentation de l'ADN (Fasulo et al., 2000 ; 2005). Concernant la forme tronquée se terminant par le résidu D421, des études ont montré que la surexpression de cette espèce de Tau dans des cellules de neuroblastome humain conduisait à une augmentation des marqueurs apoptotiques (Chung et al., 2001). A côté de ce caractère plutôt toxique de ces formes tronquées, il a été montré que des espèces de Tau tronquées dans ce domaine étaient retrouvées dans le milieu extracellulaire indépendamment de la mort cellulaire mais les hypothèses restent aujourd'hui en suspend (Kanmert et al., 2015). De plus, dans l'équipe nous avons montré qu'une forme tronquée débutant par le résidu Glutamine 124 (Q124) possédait une meilleure capacité à lier et stabiliser les microtubules (Derisbourg et al., 2015). Cette étude suggère donc que le domaine amino-terminal de Tau peut jouer un rôle direct dans la régulation de la dynamique microtubulaire. Plusieurs hypothèses émergent de ces études, la délocalisation subcellulaire pourrait

être dûe à un changement de conformation qui dévoilerait un potentiel signal de localisation nucléaire ; la meilleure capacité à lier les microtubules serait peut être la conséquence d'une meilleure disponibilité de la protéine Tau qui ne serait plus liée à des partenaires protéiques. Toutes ces hypothèses sont encore très controversées car le domaine amino-terminal de Tau n'est pas très bien caractérisé aujourd'hui.

C.5. Les potentiels acteurs impliqués dans la troncation de la protéine Tau

Comme abordé lors des paragraphes précédents, les formes tronquées de Tau peuvent être générées par différentes classes de protéases, certaines sont d'ailleurs associées à un site de troncation (Hanger and Wray, 2010). Aujourd'hui, la génération de tous les sites de troncation n'est pas expliquée. La protéine Tau est le substrat de nombreuses caspases (*Cysteinylyl Aspartate Specific Protease*) qui appartiennent à la famille des protéases à Cystéine, elles existent sous la forme de pro-caspases et subissent un clivage protéolytique afin d'être active (Miller, 1997). Les caspases sont spécifiques d'une séquence consensus Asp-X-X-Asp (DXXD), où les résidus X peuvent être variables. Actuellement, les caspases 1, 3, 6, 7 et 8 ont été montrées pour cliver Tau dans les parties amino- et carboxy-terminales (Rissman et al., 2004). Il a notamment été montré que la forme tronquée se terminant par le résidu D421 était générée sous l'action de la caspase 3 (Gamblin et al., 2003b). En plus des caspases, il a été observé une activation des calpaïnes dans le tissu cérébral de patients Alzheimer ; cette activation colocalise avec la DNF (Saito et al., 1993). Il y a notamment, une forme tronquée d'environ 17kDa qui a été retrouvée au sein du cerveau de patients Alzheimer, dont le niveau d'expression est en lien avec l'activation des calpaïnes (Ferreira and Bigio, 2011). A contrario, l'inhibition des calpaïnes par la calpastatine dans un modèle transgénique murin entraîne une diminution du niveau de phosphorylation, de la troncation et de la fibrillogenèse de Tau (Rao et al., 2014). En outre de ces protéases cytoplasmiques, l'implication de protéases lysosomiales a été analysée sur la troncation de Tau. Ainsi, il a été observé la colocalisation d'une protéase à Aspartate, la cathepsine D avec la DNF (Cataldo and Nixon, 1990 ; Cataldo et al., 1991). De plus, la forme tronquée se terminant par le résidu N358 est générée

sous l'action de l'Asparagine endopeptidase, une protéase lysosomiale à Cystéine, qui est retrouvée délocalisée dans le cytoplasme et suractivée dans la maladie d'Alzheimer (Basurto-Islas et al., 2013 ; Zhang et al., 2014). Enfin, d'autres études ont montré l'implication de la thrombine (Olesen, 1994), d'une aminopeptidase et du protéasome dans la protéolyse de Tau.

Pour conclure ce second chapitre porté sur les modifications post-traductionnelles de Tau, il apparaît clairement que certaines modifications possèdent un rôle physiologique et d'autres un rôle plutôt pathologique. En plus de la nature des modifications, il faut noter l'importance des résidus touchés et leur localisation sur la protéine Tau qui possède une structure organisée en différents domaines. Concernant la troncation, cette modification est surtout décrite dans un contexte pathologique. En effet, les formes tronquées sont retrouvées dans le tissu cérébral de patients atteints de Tauopathies ainsi que dans le LCR. Elles possèdent un pouvoir pro-agrégatif important et jouent un rôle dans la formation de la DNF.

Chapitre 3 : La N- α -acétylation, une modification jamais décrite pour la protéine Tau

L'acétylation est l'une des modifications post-traductionnelles majoritaire dans la cellule eucaryote, elle est dépendante d'enzymes et du métabolisme cellulaire. Il faut bien différencier la ϵ -acétylation qui a lieu sur la chaîne latérale des résidus Lys et qui est réversible; de la N- α -acétylation qui a lieu sur le résidu situé dans l'extrémité amino-terminale de la protéine cible et qui est irréversible. Nous focaliserons dans ce dernier chapitre sur la N- α -acétylation qui est très répandue chez les eucaryotes, en effet, environ 90% des protéines sont N- α -acétylées. En fonction de la protéine ciblée, cette modification peut jouer différents rôles que nous décrirons au fil de ce chapitre. Enfin, nous transposerons la littérature connue actuellement vis-à-vis de la protéine Tau ; en effet, la N- α -acétylation n'a jamais été décrite pour Tau.

A. Découverte et généralités

C'est en 1958 que la première protéine portant un groupement N- α -acétyl a été découverte (Narita, 1958), c'était une protéine du virus de la mosaïque du tabac ; une découverte dans le monde végétal. Par la suite, de nombreuses autres protéines ont été identifiées avec cette modification aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes. La fréquence d'acétylation augmente avec la complexité de l'organisme (Soppa, 2010). Par exemple, en observant le turnover des protéines, il a été montré que 80 à 90% des protéines sont retrouvées N- α -acétylées dans des cellules provenant de carcinome et lymphome murin (Brown and Roberts, 1976 ; Brown, 1979). A contrario, chez les procaryotes il a été montré que cette modification était moins représentée, 50% des protéines étaient N- α -acétylées (Brummel et al., 1971)

B. Les mécanismes de la N- α -acétylation

B.1. La N- α -acétylation

La N- α -acétylation est un processus enzymatique qui correspond au transfert d'un groupement acétyl à partir de l'Acétyl-CoenzymeA (Ac-CoA) sur l'acide aminé en position alpha-amino d'une protéine (Gautschi et al., 2003) (**Figure 18**). Cette réaction est irréversible et neutralise les charges positives de l'extrémité amino-terminale de la protéine, elle est considérée comme la modification covalente la plus commune (Polevoda and Sherman., 2003a). Ce transfert d'un groupement acétyl est réalisé sous l'action d'une classe d'enzymes appelées les N- α -acétyltransférases (Nats). Cette réaction de transfert se produit de deux manières distinctes, majoritairement elle a lieu de façon co-translationnelle lorsque la chaîne polypeptidique néo-synthétisée contient environ 25 à 50 acides aminés (Strous et al., 1974 ; Arnesen et al., 2009a). Depuis quelques années, il a été montré que la N- α -acétylation pouvait également se produire de façon post-translationnelle sur certaines protéines (Helsens et al., 2011). Mais aujourd'hui beaucoup d'hypothèses restent invalidées sur la nature co- ou post-translationnelle de la réaction.

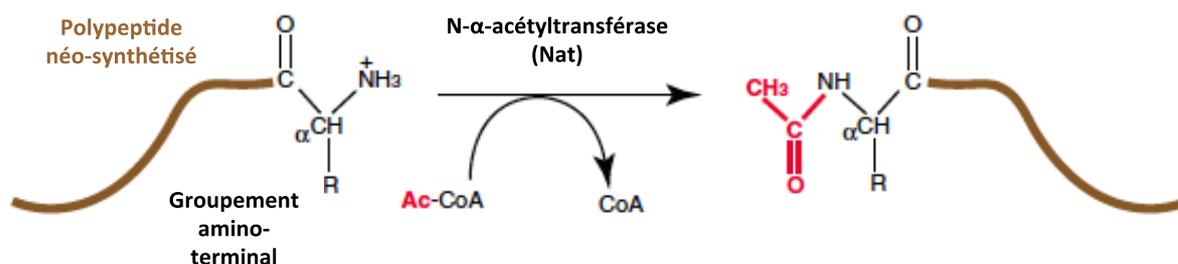


Figure 18 – Réaction de N- α -acétylation. Le transfert d'un groupement acétyl sur l'acide aminé en position alpha-amino d'une protéine est réalisé sous l'action des N-acétyltransférases (Nats). Le groupement acétyl provient de l'acétyl-CoenzymeA (Ac-CoA). (Adaptée de Starheim et al., 2012).

B.2. Les N- α -acétyltransférases (Nats)

Les Nats appartiennent à la superfamille GNAT (*General control non-derepressible5 related acetyltransferase*), les enzymes de cette famille partagent une séquence commune de reconnaissance et de fixation de l'Ac-CoA : motif Q/RxxGxG/A (Lu et al., 1996). Les Nats sont des complexes enzymatiques possédant soit une sous-unité ou plusieurs sous-unités composées d'une sous-unité catalytique et d'une ou deux sous-unités régulatrices. La sous-unité catalytique possède l'activité de transférase alors que la sous-unité auxiliaire principale module son activité et sa spécificité de substrat (Liszczyk et al., 2013). De plus, les Nats sont attachées au ribosome grâce à la sous-unité auxiliaire qui possède des motifs « *Tetratrico Peptide Repeat région* » (TPR). Ces motifs permettent les interactions entre protéines, par conséquent la N- α -acétylation peut être réalisée de manière co-traductionnelle très facilement (Polevoda et al., 2008). Il y a six Nats différentes chez les mammifères (NatA à NatF) contre seulement cinq chez les levures (NatA à NatE) (Aksnes et al., 2015a). Chez l'Homme, toutes les Nats orthologues de la levure ont été trouvées et sont conservées (Hole et al., 2011).

B.2.a. La N- α -acétyltransférase A (NatA)

La première Nat à avoir été découverte est la NatA par Sherman et ses collaborateurs en 1989 (Mullen et al., 1989). Elle se compose d'une sous-unité catalytique Naa10 et d'une sous-unité régulatrice Naa15, elle est la Nat majoritaire (Arnesen et al., 2009b) (**Figure 19**). Il a été montré qu'elle était associée au ribosome, notamment chez la levure où une étude a montré que l'ancrage de la NatA est réalisé par la sous-unité régulatrice (Gautschi et al., 2003). Cependant, une fraction de la NatA a également été observée non associée au ribosome chez l'Homme, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de N- α -acétylation. Par exemple, il a été démontré que la Naa10 N- α -acétyle l'actine β et l'actine γ de manière post-traductionnelle et indépendamment de la sous-unité régulatrice Naa15 (Van Damme et al., 2011a).

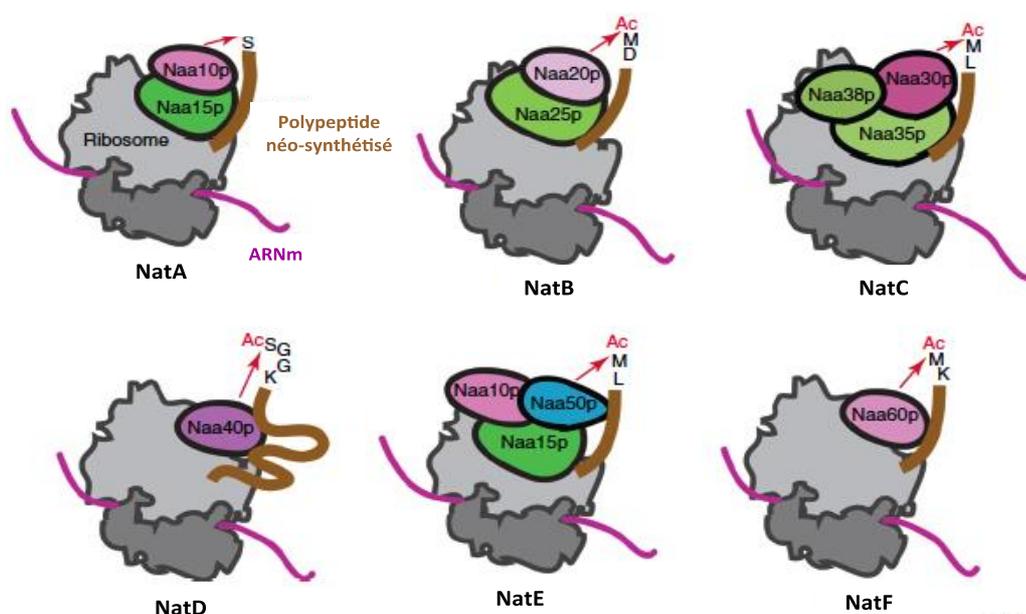


Figure 19 – La famille des N- α -acétyltransférases (Nats). Les Nats appartiennent à la famille des GNAT et partagent une séquence commune de reconnaissance et de fixation de l'Ac-CoA. Elles sont composées d'une sous-unité catalytique et d'une ou deux sous-unités régulatrices, ces sous-unités sont attachées au ribosome afin de permettre l'ajout du groupement acétyl sur le polypeptide naissant. (Adaptée de Starheim et al., 2012).

B.2.b. Les autres N- α -acétyltransférases

La NatB se compose de la sous-unité catalytique Naa20 et de la sous-unité régulatrice Naa25 (Ametzazurra et al., 2009). Tout comme la NatA, une portion des sous-unités de la NatB est retrouvée sous une forme non-ribosomale (Ametzazurra et al., 2008). La NatC est un complexe composé de la sous-unité catalytique Naa30 et de deux sous-unités régulatrices Naa35 et Naa38 (Polevoda and Sherman, 2001). Ce complexe est retrouvé associé ou non au ribosome, l'association au ribosome est réalisée grâce à la sous-unité Naa35. Concernant la sous-unité Naa38, elle est beaucoup moins décrite et son rôle reste indéterminé (Polevoda et al., 2008). La NatD n'est composée que de la sous-unité catalytique Naa40 ; ainsi elle diffère des autres Nats de par cette particularité (pour revue, Starheim et al., 2012). La NatE possède la sous-unité catalytique Naa50 annexée des sous-unités de la NatA (Naa10 et Naa15) ; cette Nat a des propriétés bien distinctes de celle de la NatA (Arnesen et al., 2006a). Il

est montré que la déplétion en la NatE n'entraîne pas les mêmes phénotypes que la déplétion en la NatA, ainsi l'activité de N- α -acétylation de la NatE est bien distincte de celle de la NatA (Gautschi et al., 2003). Enfin, la NatF a été découverte très récemment en 2011, elle se compose uniquement de la sous-unité catalytique Naa60 (Van Damme et al., 2011b) (**Figure 19**).

B.3. Les spécificités de substrat des Nats

Comme décrit précédemment, il y a différentes Nats. Chacune de ces Nat est spécifique d'un groupe de substrats particulier. En effet, la spécificité est généralement déterminée par la nature des deux premiers acides aminés de la protéine cible (pour revue, Starheim et al., 2012) (**Figure 20**).

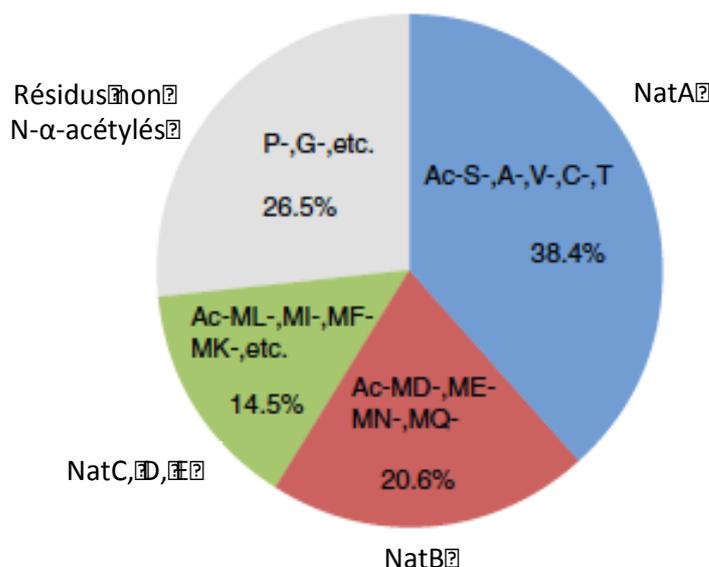


Figure 20 – Les spécificités de substrats des Nats. Cette spécificité est basée sur la distribution des deux premiers acides aminés de chaque séquence protéique. Certains résidus tels que les Pro et Gly ne sont jamais N- α -acétylés. La NatA N- α -acétyle le premier résidu d'une protéine indépendamment du deuxième résidu, pour les autres Nats, elles N- α -acétylent le premier résidu en fonction de la nature du second. (Adaptée de Starheim et al., 2012).

Pour exemple, la NatA N- α -acétyle les résidus Ser, Ala, Thr, Gly, Val et Cys localisés après la Methionine initiatrice (iMet) de la protéine. Il est notamment décrit que la N- α -acétylation de ces résidus est réalisée lorsque la iMet est clivée sous l'action d'une aminopeptidase (Polevoda et al., 1999). Ces extrémités aminoterminales sont très représentées chez les eucaryotes ce qui explique que la NatA est l'enzyme majoritaire. La NatB permet la N- α -acétylation des iMet lorsqu'elles sont suivies des résidus Asp, Glu, Asn ou Gln (Ametzazzura et al., 2008). Les NatsC, E et F N- α -acétylent les iMet lorsqu'elles sont succédées par des résidus amphipathiques ou hydrophobiques tels que Leu, Val, Ala, Phe, Tyr, Lys et Ile (pour revue, Starheim et al., 2012). Pour la NatD, seuls deux substrats ont été identifiés chez la levure et l'humain : les histones H2A et H4 dont la iMet est suivie d'un résidu Ser (Song et al., 2003). Il est à noter que les protéines commençant par un résidu Pro ne sont jamais retrouvées N- α -acétylées (Goetze et al., 2009).

B.4. Rôles physiologiques cellulaires des Nats

Beaucoup d'études ont montré un rôle essentiel des Nats dans le développement. En effet, chez le poisson zèbre la délétion de la sous-unité catalytique Naa10 entraîne un retard de développement et une létalité sévère (Ree et al., 2015). D'autres études réalisées chez le « *Caenorhabditis elegans* » et la « *Drosophila melanogaster* » ont montré que l'absence de la Naa10 était létale également (Sonnichsen et al., 2005 ; Wang et al., 2010b). En plus de ces études, des données ont montré un rôle dans le cycle cellulaire et l'apoptose. La délétion de la sous-unité catalytique Naa10 dans des lignées cancéreuses humaines entraîne une délétion des gènes impliqués dans la survie cellulaire, à l'inverse la surexpression de la Naa10 permet une régulation positive des gènes impliqués dans la survie cellulaire (Fisher et al., 2005). D'autres études montrent que la délétion de la sous-unité catalytique Naa10 dans des lignées cellulaires humaines, induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Arnesen et al., 2006b). Ainsi, la NatA joue un rôle important dans le cycle cellulaire et la croissance cellulaire. Des études similaires ont démontré que la

délétion de la NatB dans des lignées cellulaires humaines conduit à un arrêt du cycle cellulaire (Starheim et al., 2008).

A côté des effets sur le cycle cellulaire, une équipe a montré que la NatA est impliquée dans la croissance dendritique. En effet, l'alpha-tubuline qui compose les dimères de la tubuline, apparaît comme un substrat particulier de la NatA. Cette spécificité de substrat n'étant pas identique à celle établie pour la NatA, les auteurs proposent que la N- α -acétylation peut avoir lieu de manière post-traductionnelle (Ohkawa et al., 2008). Ainsi, l'alpha-tubuline acétylée sur la Lysine40 permet une stabilisation des microtubules, il est d'ailleurs observé une colocalisation de la NatA avec les microtubules acétylés (Wloga and Gaertig, 2011). Dans le contexte neuronal, il a également été décrit une implication des Nats dans le développement neuronal. En effet, par hybridation *in situ* il a été observé une haute expression des sous-unités catalytique Naa10 et régulatrice Naa15 dans le cerveau murin en développement ; où les cellules sont division et migration. Alors qu'une baisse d'expression de la NatA est observée dans les neurones différenciées (Sugiura et al., 2003). Concernant la NatB, il a été montré que pendant le développement cérébral la sous-unité régulatrice Naa25 était fortement exprimée alors que la sous-unité catalytique Naa20 est exprimée plus tardivement. De plus, ces variations d'expression temporelle sont également corrélées avec des variations spatiales, la co-expression des deux sous-unités est restreinte à l'aire préoptique, le noyau thalamique paraventriculaire et les neurones cérébelleux profonds (Ohyama et al., 2012). Alors que chez l'adulte, la sous-unité catalytique Naa20 est plus largement exprimée, notamment au niveau de l'hippocampe et du cortex (*Allen Brain*).

De plus, des équipes ont montré l'implication des Nats dans la structure et la fonction des organelles. Notamment, l'implication de la NatC dans le maintien de l'intégrité mitochondriale, en effet, la déplétion en NatC dans des lignées cellulaires entraîne une diminution des protéines mitochondriales et une fragmentation des mitochondries (Van Damme et al., 2016). Mais aussi, le rôle essentiel de l'association de la NatF à l'appareil de Golgi pour maintenir son intégrité structurelle, notamment

en N- α -acétylant les protéines transmembranaires de cet organite (Aksnes et al., 2015b).

Enfin, la distribution tissulaire des Nats est également importante, par exemple la NatA possède une expression ubiquitaire avec une haute expression notamment au niveau cérébral et cardiaque (Jeong et al., 2002). Des études biochimiques ont montré que la sérotonine, neurotransmetteur du SNC subissait une N- α -acétylation afin d'être converti en mélatonine dans la glande pinéale (Heim et al., 1991). Cette modification n'était pas réalisée par la NatA du fait de son absence dans la glande pinéale. En revanche, une étude ultérieure a montré la présence de la NatB dans la glande pinéale, cette Nat pourrait potentiellement être responsable de la N- α -acétylation de la sérotonine mais à ce jour l'hypothèse n'a pas été validée (Ohyama et al., 2012).

C. Les fonctions variées de la N- α -acétylation

Du fait que 80 à 90% des protéines chez les eucaryotes soient N- α -acétylées, la fonction générale de cette modification n'a pas pu être déterminée. Au contraire, en fonction des classes de protéines touchées, la N- α -acétylation peut jouer différents rôles (**Figure 21**).

C.1. La N- α -acétylation affecte la stabilité protéique

Pendant de nombreuses années, des études ont révélé que la N- α -acétylation permettait de protéger les protéines de la dégradation et les rendait plus stables (Jornvall, 1975 ; Hershko et al., 1984). En effet, les protéines sont inscrites dans un cycle de synthèse et de dégradation qui est hautement régulé, notamment par le système ubiquitine/protéasome. Ainsi, la N- α -acétylation était décrite comme une modification empêchant l'ubiquitinylation, et par conséquent la dégradation protéique (Kuo et al., 2004). C'est en 2008, que l'équipe de Varshavsky a mis en évidence que la N- α -acétylation déstabilisait les protéines et créait un signal de dégradation (Varshavsky, 2008 ; Hwang et al., 2010). En effet, il a été observé que l'ubiquitine

ligase Doa10 était capable de reconnaître les séquences amino-terminales N- α -acétylées des protéines. Après reconnaissance, cette enzyme ajoute des molécules d'ubiquitine afin d'envoyer les protéines vers la voie de dégradation protéasomale (Varshavsky, 2011). La N- α -acétylation semble donc agir comme un signal de « contrôle qualité » des protéines, aujourd'hui les deux résultats observés restent valables et dépendent notamment de la cible protéique touchée.

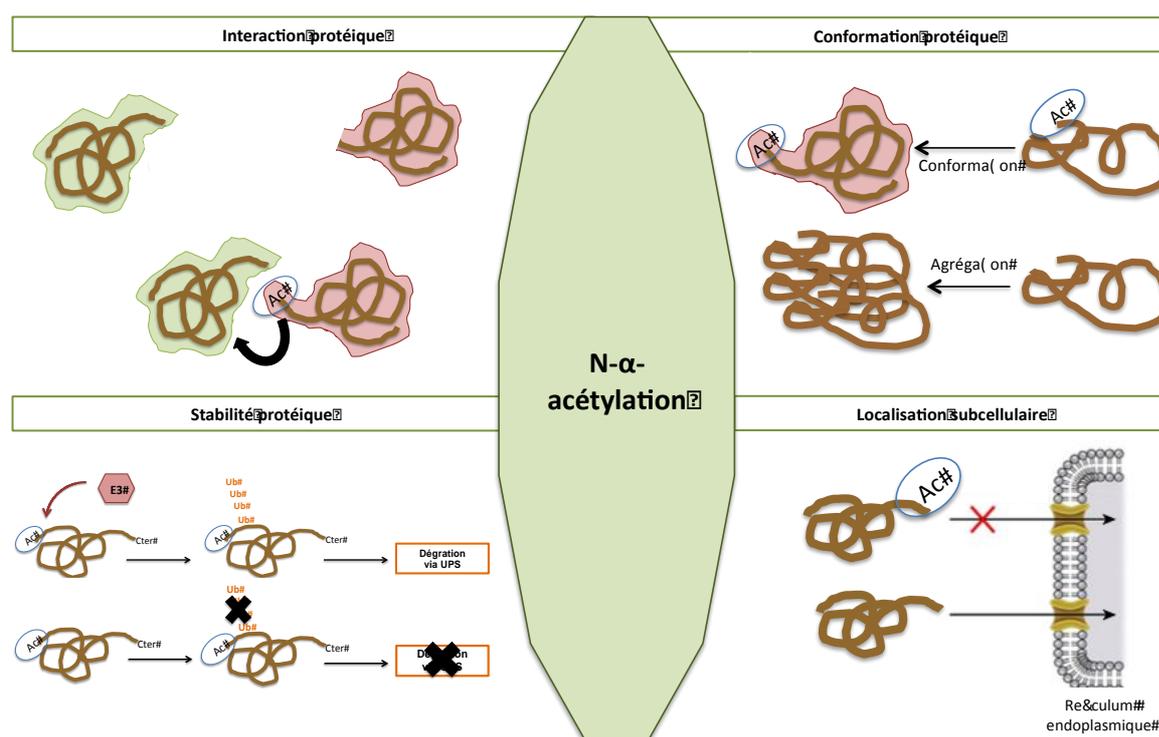


Figure 21 – Les fonctions de la N- α -acétylation sur les protéines. Cette modification co- et post-traductionnelle joue différents rôles, en fonction des protéines ciblées. Concernant la stabilité protéique, les études divergent quand aux conséquences de la N- α -acétylation : cela peut favoriser ou empêcher la dégradation protéique. La N- α -acétylation permet une mise en conformation des protéines et une interaction entre protéines. De plus, elle régule aussi la localisation subcellulaire notamment au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. (Adaptée de Aksnes et al., 2016).

C.2. La N- α -acétylation influence la localisation subcellulaire des protéines

Après avoir découvert que la N- α -acétylation avait un impact sur la stabilité protéique, des études ont suggérées qu'elle pouvait directement affecter la localisation des protéines. En effet, chez la levure, il a été montré que la GTPase Arl3p devait être

N- α -acétylée pour être envoyée dans l'appareil de Golgi (Behnia et al., 2004). A l'inverse, les protéines destinées à la voie sécrétrice contiennent une séquence signal à l'extrémité amino-terminale qui leur permet d'être dirigées vers le réticulum endoplasmique. Ainsi, il a été montré que la N- α -acétylation de ces protéines entraînait leur rétention dans le cytosol (Forte et al., 2011). On peut noter que l'absence de N- α -acétylation sur la séquence signal permet la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ici la modification entraîne un défaut de reconnaissance de cette séquence signal. Comme pour les effets sur la stabilité protéique, les effets sur la localisation subcellulaire restent très variables en fonction de la protéine cible.

C.3. La N- α -acétylation régule les interactions protéiques

La N- α -acétylation altère les propriétés de l'extrémité amino-terminale des protéines, les interactions protéine/protéine semblent être modulées par cette modification. En effet, la NatC est capable d'augmenter l'affinité et l'interaction entre les protéines Ubc12 (*E2 Ubiquitin-Conjugating enzyme*) et Dcn1 (*E3 Ubiquitin ligase*) (Scott et al., 2011). La N- α -acétylation d'Ubc12 sur la iMet entraîne une meilleure présentation de la séquence peptidique à son partenaire. Ce concept a été étendu à de nombreuses ligases présentes chez les mammifères (Monda et al., 2013). Concernant la NatB, il a été montré qu'elle jouait un rôle important dans la formation du complexe actine-tropomyosine (Polevoda et al., 2003b). En effet, la tropomyosine N- α -acétylée permet une liaison plus forte avec l'actine, ce qui a pour conséquence une régulation de l'activité motrice de la myosine (Coulton et al., 2010). Ici, la N- α -acétylation apparaît comme une modification en faveur des interactions protéiques mais les mécanismes impliqués restent encore inexpliqués.

C.4. La N- α -acétylation affecte la conformation des protéines

Comme décrit précédemment, l'ajout d'un groupement acétyl sur le groupe N- α du premier acide aminé d'une protéine entraîne une neutralisation des charges

positives à son extrémité amino-terminale. En 2014, un potentiel rôle de la N- α -acétylation sur la conformation des protéines a été décrit. Cette hypothèse provient de l'observation chez la levure déficiente en NatA d'une accumulation de protéines malconformées (Holmes et al., 2014). De plus, dans des cellules humaines également déplétées en NatA et surexprimant l'HYPK (*Huntingtin-interacting protein K*), une agrégation de l'Huntingtine est observée (Arnesen et al., 2010). En effet, l'HYPK forme un complexe avec la NatA qui est essentiel pour la propre conformation de l'Huntingtine. Toutes ces données montrent la diversité des fonctions exercées par la N- α -acétylation en fonction du contexte cellulaire et de la protéine ciblée.

D. La N- α -acétylation impliquée dans de nombreuses pathologies

La N- α -acétylation est une modification très répandue, elle touche de nombreuses protéines appartenant à différentes classes. Ainsi, des dysfonctions soit des Nats en elles-mêmes, ou bien du stock d'Ac-CoA disponible peuvent conduire au développement de pathologies diverses. L'acétylation dépend du métabolisme et de l'homéostasie énergétique. En effet, l'Ac-CoA est majoritairement produit à partir de la glycolyse et intervient dans le cycle de Krebs, notamment pour la production d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP). Ainsi, un dérèglement de ces voies métaboliques entraîne un stock d'Ac-CoA défaillant, ce qui a pour conséquence un mauvais fonctionnement de la machinerie d'acétylation et le développement de maladies sévères telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires et les maladies neurodégénératives (Kalvik and Arnesen, 2013 ; Saha and Pahan, 2006).

D.1. Les pathologies humaines causées par des mutations des Nats

Durant ces dernières années, de nombreuses mutations ont été découvertes sur le gène codant pour la sous-unité catalytique de la NatA : Naa10. Il a été montré que tous les patients portant une mutation de la Naa10 développaient des signes cliniques communs. En 2011, le Syndrome d'Ogden a été découvert, c'est une maladie

génétique liée au chromosome X affectant les enfants de sexe masculin. Il est causé par la mutation S37P sur le gène codant la Naa10 (Rope et al., 2011). D'un point de vue clinique, ce syndrome entraîne un retard développemental, une hypotonie, des anomalies craniofaciales, une cardiomyopathie, etc., ce qui conduit à une létalité importante pendant l'enfance (pour revue, Drazic et al., 2016). Des analyses cellulaires et biochimiques ont montré que la mutation de la Naa10 engendrait une réduction de la formation du complexe enzymatique Naa10/Naa15. De plus, des expériences *in vitro* ont révélé que l'activité catalytique de la NatA est réduite de 80% (Myklebust et al., 2014). Par la suite, d'autres mutations de la sous-unité Naa10 ont été identifiées chez des filles et garçons (Saunier et al., 2016). Aujourd'hui, seules des mutations pour la NatA ont été découvertes.

D.2. Implication des Nats dans les cancers

De nombreuses études ont montré un lien entre les Nats et le cancer, particulièrement pour la NatA. En effet, la sous-unité Naa10 est proposée comme une oncoprotéine et/ou un suppresseur de tumeur (Kalvik and Arnesen, 2013 ; Midorikawa et al., 2002). Cette complexité résulte du fait que la NatA est la Nat majoritaire et qu'elle possède de nombreux substrats protéiques impliqués dans différentes voies cellulaires.

Dans un premier temps, nous focaliserons sur les fonctions oncogènes de la NatA. Initialement, c'est dans le carcinome thyroïdien que la sous-unité Naa15 a été identifiée avec un haut taux d'ARNm (Fluge et al., 2002). Par la suite, la surexpression de la Naa15 a été retrouvée dans de nombreux cancers agressifs (neuroblastome, cancer gastrique, etc.) (Martin et al., 2007). A l'inverse, de récentes études ont montré une expression diminuée de la Naa15 dans les cellules leucémiques myéloïdes (Kalvik and Arnesen, 2013). Comme pour la Naa15, la sous-unité Naa10 est surexprimée dans de nombreux cancers (cancer du sein, de la prostate, du poumon, etc.). Il est notamment montré que l'expression de Naa10 corrèle avec des tumeurs agressives et un faible taux de survie (Ren et al., 2008). Ainsi, la sous-unité Naa10 est décrite pour

réguler la prolifération et la survie cellulaire, sa surexpression dans des cellules cancéreuses entraîne une augmentation de leur prolifération alors que sa délétion entraîne une induction de l'apoptose (Arnesen et al., 2006b ; Yu et al., 2009).

Dans la littérature, il a également été décrit des propriétés de suppresseur de tumeur pour la Naa10. En effet, une équipe a observé que la Naa10 est nécessaire pour induire l'apoptose et l'activation des caspases (Yi et al., 2007). En plus d'induire l'apoptose, il a été montré que la Naa10 inhibe la migration et l'invasion cellulaire conduisant à la formation de métastases. Aujourd'hui beaucoup d'études sont controversées sur les mécanismes impliqués dans ce phénomène d'anti-tumorigenèse (Zeng et al., 2014). Cependant, ces études encouragent au développement d'inhibiteurs ou activateurs des Nats comme potentielle thérapie même si les Nats sont impliqués dans de nombreuses fonctions (Foyen et al., 2013).

D.3. La N- α -acétylation et les Nats dans les maladies neurodégénératives

Comme décrit dans le premier chapitre, les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington sont caractérisées par l'accumulation de matériel protéique insoluble dans le tissu cérébral. Des dysfonctions dans le processus de N- α -acétylation sont associés avec ces pathologies (pour revue, Aksnes et al., 2016).

L'HYPK (*Huntingtin Interacting Protein K*) est une chaperonne connue pour empêcher l'agrégation de l'Huntingtine. En effet, dans la maladie d'Huntington qui est une maladie à expansion de triplets de nucléotides, la protéine Huntingtine possède plus de 36 glutamines. Cette forme polyglutaminée adopte un changement de conformation menant à son agrégation (Raychaudhuri et al., 2008). Il a été montré que la délétion de la NatA dans une lignée cellulaire humaine entraîne la diminution d'expression de l'HYPK qui a pour conséquence une agrégation de la Huntingtine (Arnesen et al., 2010). La Huntingtine étant un des substrats de la NatA, son agrégation suggère donc un lien entre la NatA et la pathologie.

Dans la maladie de Parkinson, l' α -synucléine forme des agrégats composés de nombreux feuillets β , ces structures particulières sont nommées Lewy bodies (Spillantini et al., 1998a). La N- α -acétylation de l' α -synucléine est médiée par la NatB, il a été démontré que l' α -synucléine N- α -acétylée était résistante à l'agrégation (Bartels et al., 2014 ; Trexler and Rhoades, 2012). En effet, sous cette forme la protéine a tendance à former des hélices α stables et son interaction à la membrane ou avec d'autres partenaires protéiques est améliorée. Tout comme dans la maladie de Huntington, ici la N- α -acétylation apparaît comme une modification favorable et empêchant le développement de pathologie.

Une autre étude a montré que la NatA pourrait avoir un rôle dans la maladie d'Alzheimer. En effet, il a été observé dans des lignées cellulaires humaines transfectées avec la sous-unité Naa10 et l'APP, une interaction entre ces deux partenaires protéiques, notamment avec la partie cytoplasmique de l'APP (Asaumi et al., 2005). De plus, il a été montré que la co-expression avec la Naa15 entraîne une réduction de la génération du peptide A β ce qui indique que la NatA stabilise l'APP et/ou la N- α -acétylation de l'APP entraîne une diminution de la synthèse du peptide A β . A ce jour il n'y a pas de résultats complémentaires à cette étude.

Pour conclure sur ce chapitre, la N- α -acétylation est une modification co- et post-traductionnelle très répandue chez les eucaryotes. Ainsi, elle permet la régulation de nombreuses fonctions, notamment via ses rôles dans la stabilité protéique, les interactions entre protéines et la localisation subcellulaire des protéines. Aujourd'hui toutes les protéines qui sont N- α -acétylées ne sont pas connues mais concernant la protéine Tau, elle a été retrouvée N- α -acétylée dans le tissu cérébral de patients Alzheimer. De plus, cette modification n'est pratiquement pas étudiée dans le cadre des maladies neurodégénératives, ainsi quel rôle peut jouer la N- α -acétylation sur la protéine Tau ?

Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans une thématique de recherche orientée autour de la maladie d'Alzheimer et des Tauopathies qui regroupent un ensemble de maladies neurodégénératives caractérisées par l'agrégation de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées. Aujourd'hui, les mécanismes impliqués dans l'agrégation de Tau et le développement du processus physiopathologique ne sont pas tous élucidés. Il apparaît clairement qu'une dérégulation des modifications post-traductionnelles est un élément conduisant à la pathologie Tau. Parmi ces modifications, on retrouve la troncation qui correspond à la protéolyse partielle et qui génère des formes de la protéine Tau tronquées de leurs parties amino- et/ou carboxy-terminales. De nombreux travaux ont montré la présence de formes tronquées dans les parties amino- et carboxy-terminales de Tau au sein de tissu cérébral provenant de patients Alzheimer, dont l'identité précise n'est pas encore bien déterminée. Certaines d'entre elles ont été identifiées, notamment des formes tronquées de leur domaine carboxy-terminal. De ce fait, la plupart des études fonctionnelles se sont focalisées sur les formes tronquées se terminant par les résidus E391 et D421, des outils immunologiques ont permis de mieux comprendre leur implication dans la pathologie Tau.

A ce jour, l'identité et le rôle de toutes les formes tronquées de Tau ne sont pas connus, notamment celles tronquées de leur partie amino-terminale. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse, il se concentre sur l'étude d'une nouvelle forme de Tau tronquée de sa partie amino-terminale ; débutant à la Méthionine 11 (forme tronquée Met11-Tau) qui a été identifiée récemment au sein du laboratoire (Derisbourg et al., 2015). Nous avons également détecté cette forme tronquée de Tau sous forme N- α -acétylée (AcMet11-Tau). Ainsi, ce travail de thèse s'articule autour de 3 objectifs : le premier a consisté en la génération et la caractérisation d'un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre la forme tronquée AcMet11-Tau. Par la suite, cet anticorps a été utilisé afin d'analyser des tissus cérébraux humains et de souris transgéniques, dans le but d'établir s'il existe une association ou non de la forme tronquée AcMet11-Tau avec la pathologie Tau. Enfin, des outils cellulaires et moléculaires ont été générés en vue des études fonctionnelles de la forme tronquée

Met11-Tau et pour déterminer le rôle de la N- α -acétylation, une modification jamais décrite pour Tau.

Matériels & Méthodes

A. Matériels

A.1. Lignée cellulaire

Les cellules SH-SY5Y sont issues d'une lignée de neuroblastome humain (SK-N-SH) dérivée d'une métastase nichée dans la moelle osseuse et qui provient d'une tumeur du système nerveux périphérique. Elles possèdent un phénotype épithélial et peuvent être différenciées en cellule de type neuronal présentant des prolongements neuritiques lors d'un traitement au NGF (*Nerve Growth Fator*). Afin d'établir les modèles cellulaires stables surexprimant de façon inductible les protéines Tau1N4R, Tau1N3R, Met11-Tau4R et Met11-Tau3R ; la lignée SH-SY5Y/TR établie au laboratoire a été utilisée. Cette lignée cellulaire a été obtenue après transfection de la lignée SH-SY5Y avec le vecteur plasmidique pcDNA6/TR (*Invitrogen*). Cette lignée exprime, de manière stable et constitutive le répresseur de l'opéron tétracycline (*TetR*) nécessaire au fonctionnement du système de surexpression inductible T-Rex (*Invitrogen*). Ce vecteur contient une résistance à la Blastidine qui a permis au préalable la sélection des clones stablement transfectés par le pcDNA6/TR.

A.2. Tissu cérébral murin

Les échantillons utilisés proviennent du modèle murin Thy-Tau22, développé au sein du laboratoire, surexprimant sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1.2, l'isoforme Tau1N4R humaine portant les mutations G272V et P301S. Les souris sont de fond génétique 100% C57Bl6/J, elles sont maintenues et utilisées sous forme hétérozygote par croisements avec des souris C57Bl6/J provenant de chez Charles River. Les souris n'exprimant pas le transgène au sein des portées obtenues servent de souris Wild-Type (WT). L'ensemble des protocoles développés a fait l'objet d'un avis favorable du comité d'éthique des Hauts de France.

A.3. Tissu cérébral humain

Les échantillons cérébraux de patients atteints des différentes Tauopathies (maladie d'Alzheimer, maladie de Pick, DFTP-17) et d'individus sains proviennent de la Lille NeuroBank du Centre de Ressources Biologiques du CHU de LILLE. La Lille NeuroBank a été déclarée au Ministère de la recherche française le 14 août 2008 sous la référence DC-2000-642 et remplit les critères législatifs sur les ressources biologiques incluant un comité d'éthique médical et la protection des données. Les échantillons utilisés pour cette étude sont répertoriés ci-dessous (**Tableau 1**), il s'agit de cortex frontal, temporal, d'hippocampe et de mésencéphale. Pour les tissus cérébraux provenant de la maladie d'Alzheimer, la dénomination des stades de Braak est réalisée par des neuropathologistes (Dr Maurage et Dr Deramecourt) selon l'analyse histologique et la classification de Braak et Braak (Braak et al., 2011).

CONFIDENTIEL

Cas	Pathologie	Neuropathologie (DNF)	Age	Délai PM (h)	Régions cérébrales	Applications
1	sain	SB 0	29	20	T	WB - ELISA
2	sain	SB 0	61	ND	T - F	WB - ELISA
3	sain	SB 0	75	7	T	WB - ELISA
4	sain	SB 0	80	24	T	WB - ELISA
5	sain	SB 0	22	24	T	WB - ELISA
6	sain	SB 0	76	14	T	WB - ELISA
7	sain	SB 0	82	48	T - F	WB - ELISA
8	Alzheimer	SB 5	76	3	T - F	WB - ELISA
9	Alzheimer	SB 4	84	18	T - F	WB - ELISA
10	Alzheimer	SB 6	86	10	T - F	WB - ELISA
11	Alzheimer	SB 3	76	10	T - F - Hipp	WB - ELISA - IHC
12	Alzheimer	SB 5	62	10	T - F	WB - ELISA
13	Alzheimer	SB 5	77	6	T - F	WB - ELISA
14	Alzheimer	SB 6	73	22	T - F	WB - ELISA - IHC
15	Alzheimer	SB 6	57	23	T - F	WB - ELISA
16	Alzheimer	SB 6	72	5h30	T - F	WB - ELISA - IHC
17	Alzheimer	SB 6	86	10	F	WB - ELISA
18	Alzheimer		63	18	F	WB - ELISA
19	Pick		71	21	Hipp	WB - ELISA - IHC
20	Pick		68	11	F	WB - ELISA - IHC
21	Pick		ND	ND	F	WB - ELISA
22	Pick		57	22	F - Hipp	WB - ELISA - IHC
23	Pick		85	21	F	WB - ELISA
24	DFTP-17		24	ND	F	WB - ELISA
25	DFTP-17		85	21	Hipp	WB - ELISA - IHC
26	DFTP-17		ND	ND	F	WB - ELISA
27	PSP		82	4h30	F	WB - ELISA
28	PSP		75	7	F	WB - ELISA
29	PSP		57	20	F- Més	WB - ELISA
30	PSP		77	17	F- Més	WB - ELISA
31	PSP		82	11	F- Més	WB - ELISA
32	PSP		77	9	F- Més	WB - ELISA
33	PSP		85	17	F- Més	WB - ELISA
34	PSP		87	ND	F- Més	WB - ELISA
35	PSP		79	ND	F- Més	WB - ELISA
36	PSP		74	ND	F- Més	WB - ELISA
37	PSP		77	ND	F- Més	WB - ELISA
38	PSP		90	ND	F- Més	WB - ELISA
39	sain	SB 0	80	ND	F - Hipp	IHC
40	Alzheimer	SB 6	60	ND	F - Hipp	IHC
41	Alzheimer	SB 5	85	ND	F - Hipp	IHC
42	Alzheimer	SB 6	60	ND	F - Hipp	IHC
43	Alzheimer	SB 6	63	ND	F - Hipp	IHC
44	sain	SB 0	58	12	F- Hipp	IHC
45	sain	SB 0	20	26	F- Hipp	IHC
46	Alzheimer	SB 6	67	36	F	IHC
47	Alzheimer	SB 6	67	9h30	F	IHC
48	sain	SB 0	51	ND	F	IHC
49	sain	SB 0	74	48	F - Hipp	IHC
50	sain	SB 0	41	11	F - Hipp	IHC
51	Alzheimer	SB 6	84	3	F	IHC
52	Alzheimer	SB 5	78	10	F	IHC
53	sain	SB 0	72	72	F	IHC
54	sain	SB 1	39	26	F	IHC
55	sain	SB 2	47	39	F	IHC
56	Alzheimer	SB 5-6	94	6	F	IHC
57	Alzheimer	SB 5-6	78	17	F	IHC
58	sain	SB 0	43	13	F	IHC
59	DFTP-17		53	29	T	IHC
60	DFTP-17		54	31	T	IHC
61	DFTP-17		70	30	T	IHC
62	DFTP-17		62	29	T	IHC
63	DFTP-17		43	6	T	IHC
64	DFTP-17		66	30	T	IHC
65	DFTP-17		65	ND	T	IHC
66	DFTP-17		72	7	T	IHC

Tableau 1 – Tableau présentant l’ensemble des tissus cérébraux humains utilisés pendant cette étude. L’ensemble de ces tissus cérébraux ont été utilisés pour différentes applications (WB : western blot, IHC : immunohistochimie et dosage ELISA). De plus, pour les études d’association avec la pathologie Tau de la forme tronquée AcMet11-Tau, différentes zones cérébrales ont été utilisés (Hipp : hippocampe, F : cortex frontal, T : cortex temporal et Més : mésencéphale).

B. Méthodes

B.1. Culture cellulaire

B.1.a. Entretien des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂. Elles sont cultivées dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen*) supplémenté en sérum de veau fœtal 10%, en acides aminés non essentiels (*Invitrogen*) 1mM, en L-glutamine (*Invitrogen*) 2mM et en pénicilline/streptomycine 50U/ml. La division et la mise en culture des cellules sont réalisées comme suit : les cellules sont préalablement rincées au PBS (Phosphate Buffer Saline) (*Invitrogen*) et une solution de trypsine/EDTA (*Invitrogen*) est ajoutée pour les détacher du support de culture. L'action de la trypsine est inhibée par ajout de milieu de culture complet ; après dissociation, une numération sur lame de Malassez (*Invitrogen*) dans le but d'ensemencer les cellules dans les conditions expérimentales appropriées, en fonction du protocole expérimental.

B.1.b. Etablissement des lignées cellulaires stables

B.1.b.1. Vecteurs plasmidiques d'expression eucaryote

Le vecteur plasmidique pcDNA4/TO d'expression eucaryote, vide ou contenant les différentes séquences d'intérêt (voir paragraphe B.1.b.2.a) a été transfecté dans la lignée SY5Y/TR. Ce vecteur possède le promoteur P_{CMV} (*Promoteur du Cytomégalovirus*) et la séquence opératrice de l'opéron tétracycline (TetO₂). La transcription sous le contrôle de ce promoteur des ADNc d'intérêt dans les cellules SY5Y/TR n'est possible qu'en présence de Tétracycline. En effet, le TetR exprimé constitutivement dans les cellules SY5Y/TR, se fixe sur la séquence TetO₂ et empêche la transcription du gène d'intérêt. L'ajout de tétracycline (*Sigma*, 1µg/mL) qui en se fixant sur le TetR engendre la perte d'affinité de celui-ci pour la séquence TetO₂ et permet l'expression du transgène.

B.1.b.2. Construction des vecteurs d'expression inductibles

Les plasmides pcDNA3.1 contenant les ADNc des 2 isoformes de la protéine Tau : Tau1N4R et Tau1N3R étaient disponibles au laboratoire. Ils ont servi de matrice pour réaliser l'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). L'insertion des ADNc d'intérêt dans le plasmide pcDNA4/TO a été réalisée grâce au kit *In-Fusion* (*Clontech*) qui permet un clonage directionnel par recombinaison en utilisant des amorces qui encadrent l'insert et chevauchent partiellement la séquence du vecteur.

B.1.b.2.a. Les amorces

Les amorces sont compatibles avec l'utilisation du kit *In-Fusion* (*Clontech*), elles ont été choisies de manière à ce qu'elles encadrent la séquence codante d'intérêt et qu'elles permettent une insertion directionnelle dans le site EcoRI du vecteur de clonage pcDNA4/TO :

- les amorces sens qui comprennent le codon ATG dans un environnement Kozak sont les suivantes :

Pour l'amplification des ADNc de Tau1N4R et Tau1N3R :

5'-CAGTGTGGTGGGAATTCGCCACCATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTT-3';

Pour l'amplification des formes tronquées Met11-Tau-4R et Met11-Tau3R :

5'-CAGTGTGGTGGGAATTCGCCACCATGGAAGATCACGCTGGGACGT-3';

- l'amorce anti-sens est identique pour les 4 différentes séquences codantes amplifiées:

5'-GATATCTGCAGAATTCTCACAAACCCTGCTTGGCCAGGGAGGCA-3'.

B.1.b.2.b. Amplification par PCR des ADNc et préparation du vecteur pcDNA4/TO

Les ADNc sont amplifiés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en utilisant l'amorce anti- sens en couple avec les différentes amorces sens (**voir ci-dessus**). Pour cela, 5ng de matrice (le plasmide recombinant pcDNA3.1 contenant l'ADNc soit de Tau-381 (3R) soit de Tau-412 (4R)) sont utilisés en présence de la polymérase

DyNAzyme (2U/ μ L, *Thermo Scientific*), de tampon « *Optimized DyNAzyme EXT Buffer* » (*Thermo scientific*), de nucléotides (10mM) et des amorces (30nM) dans un volume final de 50 μ L. La PCR est réalisée dans un thermocycleur (*Applied Biosystems*) dans les conditions suivantes : dénaturation 2 minutes à 94°C suivie de 30 cycles (dénaturation 30 secondes à 94°C, hybridation 30 secondes à 60°C et élongation 1 minute à 72°C) et de l'étape finale d'élongation de 10 minutes à 72°C. En parallèle, le vecteur vide pcDNA4/TO est digéré par l'enzyme de restriction EcoRI selon les recommandations du fournisseur (*Fermentas*). Le vecteur ainsi que les produits de PCR sont ensuite déposés en gel d'agarose 1% en vue de la vérification de la digestion du vecteur par comparaison à l'échantillon non digéré ; et de la taille attendue des ampligènes pour les produits de PCR. Ensuite, les produits de PCR et le vecteur sont purifiés à l'aide du kit « *Gel and PCR clean up* » (*Macherey-Nagel*) selon les instructions et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

B.1.b.2.b. Clonage des ADNc dans le vecteur pcDNA4/TO

Le clonage des ADNc est réalisé grâce au kit *In-Fusion* (*Clontech*). La quantité et le rapport insert/vecteur linéarisé à utiliser lors du clonage sont préalablement déterminés en utilisant l'application *Tools for In-Fusion* sur le site web de *Clontech*. La réaction de clonage se réalise à 50°C pendant 15 minutes en présence de « *In-Fusion HD Enzyme Premix* » (5X, *Clontech*). Les différents plasmides recombinés issus de la réaction sont amplifiés par introduction dans les bactéries DH5 α chimiquement compétentes selon le protocole du fournisseur (*Invitrogen*). Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu LB-agar (Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 10mM, NaOH 2mM, Agar 2%) supplémenté en Ampicilline (50 μ g/ml) afin de sélectionner les bactéries ayant intégrées le vecteur recombiné puis elles sont incubées dans une étuve à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, quelques clones parmi ceux ayant poussé en présence d'ampicilline sont isolés (une vingtaine de clones pour chaque transformation) sur milieu LB-agar puis analysés par PCR en utilisant les amorces ayant servies au clonage et le kit « *Go Taq Green Master Mix* » (*Go Taq*

DNA Polymerase, Green Go Taq Reaction Buffer 2X (pH 8,5), 400 μ M ATP, 400 μ M GTP, 400 μ M TTP, 400 μ M CTP et 3mM MgCl₂) (*Promega*). Les clones bactériens identifiés comme positifs sont ensemencés dans 100 mL de milieu LB (Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 10mM, NaOH 2mM) contenant de l'ampicilline afin de réaliser la purification des vecteurs avec le Kit Nucleobond Xtra Midi (*Macherey-Nagel*). Après purification, la concentration des vecteurs est mesurée grâce au Nanodrop (*Thermo Scientific*) à une longueur d'onde à 260nm ; la qualité de la préparation des vecteurs est évaluée par les rapport A260/A280 et A260/230 (A : Absorbance). La présence de l'insert est confirmée par digestion enzymatique des plasmides recombinés suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose 1%. La séquence des inserts est ensuite vérifiée par séquençage. Les séquençages sont réalisés par une société externe (*GATC Biotech*) et les séquences sont ensuite vérifiées par alignement grâce au logiciel MultiAlin.

B.1.b.3. Transfections stables

Les cellules en culture dans des plaques de culture 6 puits, à 50% de confluence sont transfectées en utilisant le polymère cationique PEI (Polyéthylénimine, Exgen500, *EUROMEDEX*). Un mélange ADN/Exgen dans 400 μ L de milieu DMEM dépourvu de sérum de veau fœtal est réalisé à raison de 3 μ g d'ADN pour 15 μ L d'Exgen. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 15 minutes puis répandu sur les cellules préalablement lavées au PBS. Après 3 heures, 3 mL de milieu de culture DMEM complet sont ajoutés. Après 24 heures, les cellules sont divisées au demi et le milieu est remplacé 48 heures après transfection par du milieu DMEM complet et supplémenté de Zéocine (100 μ g/mL), l'antibiotique de sélection dont le gène de résistance est porté par le vecteur pcDNA4/TO. Les clones cellulaires sont sélectionnés par maintien dans le milieu de sélection pendant 4 à 6 semaines, en le renouvelant deux fois par semaine puis les clones résistants sont alors isolés et amplifiés pour caractérisation.

B.1.c. Transfection transitoire

B.1.c.1. Surexpression de la sous-unité catalytique de la Naa20

Afin de surexprimer la sous-unité catalytique Naa20, la séquence codante de celle-ci a été insérée dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 (*Invitrogen*). Les cellules en culture dans des plaques de culture six puits, à 70% de confluence, sont transfectées en utilisant le réactif non liposomal *JetPrime (PolyPlus Transfection)*. Un mélange ADN/JetPrime dans 200 μ L de *JetPrime Buffer* est réalisé à raison de 3 μ g d'ADN pour 6 μ L de JetPrime. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 10 minutes puis ajouté sur les cellules contenant 2mL de milieu de culture complet DMEM. Après 5 heures, le milieu est remplacé par du milieu complet DMEM neuf. Après 24 heures de transfection, les lignées cellulaires sont traitées pendant 24 heures avec la tétracycline afin d'induire l'expression des transgènes.

B.1.c.2. si-RNA dirigé contre la sous-unité catalytique Naa20

Afin de réduire l'expression de la sous-unité catalytique Naa20, les cellules ont été transfectées par la méthode reverse utilisant l'agent de transfection DharmaFECT (*GE Healthcare*). Les cellules en culture dans des plaques de culture six puits, à 70% de confluence sont transfectées avec un mélange ON-TARGETplus Human NAA20 siRNA SMARTpool/ DharmaFECT dans 400 μ L de milieu DMEM dépourvu de sérum de veau fœtal et réalisées à raison de 5 μ M de siRNA pour 4 μ L de DharmaFECT. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 20 minutes et répandu sur les cellules contenant du milieu DMEM complet. Le lendemain, le milieu est renouvelé. Après 24 heures de transfection, les lignées cellulaires sont traitées pendant 24 heures avec la tétracycline afin d'induire l'expression des transgènes.

B.1.d. Infection lentivirale shRNA dirigé contre la sous-unité catalytique Naa20

La deuxième méthode utilisée pour réduire l'expression de la sous-unité catalytique Naa20 est l'utilisation de 3 vecteurs lentiviraux commercialisés exprimant des séquences shRNA ciblant Naa20 (SMART Vector Lentiviral Humain Naa20 hCMV-TurboGFP shRNA, *Dharmacon*). Les cellules en culture dans des plaques de culture douze puits, à 250000 cellules/puits, sont infectées avec une MOI de 10 (10 particules virales infectieuses par cellule). Le volume de virus approprié est ajouté dans 500µL de milieu opti-MEM (*Invitrogen*) puis mis en contact avec les cellules pendant 6 heures. Après ce temps, du milieu complet DMEM est ajouté. Les cellules sont sélectionnées par maintien dans le milieu de sélection (puromycine 0,75µg/mL, *GIBCO*) pendant plusieurs semaines, en le renouvelant deux fois par semaine puis les cellules résistantes sont alors amplifiées pour caractérisation.

B.1.e. Traitement pharmacologique

La cycloheximide (*Sigma*) est utilisée à une concentration de 20µM pendant 24 heures.

B.2. Culture primaire

B.2.a. Entretien des cultures primaires de neurones corticaux

Après sacrifice d'une ratte gestante, les aires corticales des embryons sont prélevés et placés dans du milieu de dissection (milieu L15 complémenté avec du glucose à 30 mM, *Gibco*). La boîte crânienne et les méninges sont retirées sous la loupe binoculaire. Les cortex sont ensuite rincés deux fois dans du milieu de culture (milieu neurobasal complémenté avec 2% de sérum B27, 500µM de L-glutamine et 1% d'antibiotiques/antimycotique (*Antibiotic-Antimycotic 100X, Gibco*), puis dissociés mécaniquement à l'aide de plusieurs passages dans une pipette Pasteur rodée. Le nombre de cellules de la suspension cellulaire est ensuite évalué, puis les

cellules sontensemencées au nombre de 800 000 cellules par puits dans des plaques de 6 puits. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant 10 jours (DIV10) avant d'être utilisées pour les infections avec les vecteurs lentiviraux.

B.2.b. Infection lentivirus

Les infections sont réalisées pour les vecteurs lentiviraux Tau-1N4R et Met11-Tau. Les cellules en culture dans des flasques T25 sont infectées avec 2.10^{-4} ng de vecteur lentiviral/cellule. Le volume de virus approprié est ajouté dans 700 µL de milieu puis mis en contact avec les cellules pendant 6 heures. Après ce temps, du milieu conditionné est ajouté. Les cellules sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂ jusqu'à l'utilisation pour analyse.

B.3. Génération et caractérisation de l'anticorps monoclonal 2H2/D11

B.3.a. Immunisation et obtention des hybridomes

L'anticorps 2H2/D11 a été généré par immunisation avec le peptide AcMet11-Tau (<N-α-acétyl>MEDHAGTYGLG) correspondant à la séquence de Tau de la Méthionine (Met) en position 11 à la Glycine (Gly) en position 21. Cette séquence est codée par l'exon1, qui est commun à toutes les isoformes de Tau. Un résidu de Cystéine (Cys) a été ajouté à l'extrémité C-terminale du peptide AcMet11-Tau pour la conjugaison de KLH. Les souris Balb/c ont été immunisées par voie sous-cutanée avec 3 stimulations aux jours 14, 45 et 63. Les lymphocytes de la rate de la souris présentant le titre le plus élevé ont ensuite été fusionnés avec des cellules de myélome NS1, selon la méthode décrite dans Pandey, 2010.

B.3.b. Screening des hybridomes par ELISA indirect

Les surnageants d'hybridomes ont été criblés par un ELISA indirect contre les différents peptides suivants :

- peptide Ac-Met11-Tau : <N- α -acétyl>MEDHAGTYGLG; la même séquence que le peptide utilisé comme antigène
- peptide Met11-Tau : MEDHAGTYGLG
- peptide AcMet1-Tau : <N- α -acétyl>MAEPRQEFVMEDEHAGTYGLG

Des plaques Nunc 96 puits (Maxisorp F8; *Nunc, Inc.*) sont revêtues pendant une nuit à 4°C avec 100 ng/puits de peptide AcMet11-Tau, Met11-Tau ou AcMet1-Tau (voir ci-dessus) en tampon carbonate (0.1M Na₂CO₃, 0.1M NaHCO₃, pH 9,6). Après 3 lavages avec du PBS contenant 0,05% de Tween, les plaques ont été saturées (caséine 0,1%) et les surnageants d'hybridomes ont été testés à l'aide d'anticorps conjugué à la peroxydase (goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody; *Sigma*) à une dilution de 1:4000. La tétraméthylbenzidine (*Sigma*) étant le substrat. La réaction est arrêtée par addition d'acide sulfurique et les plaques sont mesurées avec un spectrophotomètre (*Multiskan Ascent Thermo Labsystem*) à 450 nm. En addition, ces résultats sont confirmés par la méthode de Western Blot, en utilisant les surnageants d'hybridomes sur les extraits protéiques de lignée cellulaire SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R. Après sélection d'un ensemble d'hybridomes qui détectent spécifiquement le peptide AcMet11-Tau avec une légère ou sans réactivité croisée avec les autres peptides. L'hybridome 2H2/D11 a été sélectionné afin de purifier l'anticorps 2H2/D11. L'isotype de cet anticorps a été déterminé (isotype IgG2A) et le type de chaîne légère également (Kappa).

B.3.c. Immunodéplétion

Afin de démontrer la spécificité de l'anticorps 2H2/D11, celui-ci a été bloqué sur les peptides décrits ci-dessus. Avant de procéder à l'immuno-empreinte par Western Blot ou en immunohistochimie, l'anticorps 2H2/D11 a été incubé sous

agitation pendant une nuit à 4°C, dans un tampon bloquant (TNT-BSA 5%) sans ou avec excès de peptides (rapport molaire : 1/50). Cette solution est incubée de la même manière que les anticorps primaires.

B.4. Analyses biochimiques

B.4.a. Extraction des protéines totales

Les cellules en culture dans des plaques 6 puits sont rincées au PBS et lysées directement, sur glace, par ajout de 100µL de tampon RIPA (Tris-HCl 50mM, pH7,4, NaCl 150mM, EDTA 1mM, NP-40 1%, déoxycholate Na 0,5%, inhibiteur de protéases Roche, Free EDTA) puis les lysats sont soumis aux ultrasons à raison de 20 impulsions à 40Hz, homogénéisés pendant 30 minutes à 4°C afin de solubiliser les protéines et centrifugés pendant 10 minutes à 12 000g à 4°C. Les protéines sont alors dosées à l'aide du Kit *BCA protein assay* (Thermo Scientific).

Les échantillons de tissus cérébraux humains et murins sont traités de la manière suivante : un homogénat tissulaire (en moyenne 100mg de tissu cérébral humain) est préparé dans un premier temps, par sonication dans 1000 µL de tampon de cryoconservation Tris-Sucrose (Tris-HCl 10mM ; Sucrose 0,32M ; pH 7,4) additionné d'un mélange d'inhibiteurs de protéases. Ces homogénats tissulaires sont conservés à – 80°C jusqu'à utilisation. Pour les analyses en Western-Blot, 50µL de chaque homogénat sont mélangés avec 50µL du tampon de lyse RIPA Les extraits sont ensuite soniqués (10 coups à 40 hertz), homogénéisés pendant 30 min à 4°C et centrifugés pendant 10 minutes à 12000g à 4°C. Les protéines sont alors dosées à l'aide du Kit *BCA protein assay* (Thermo Scientific).

B.4.b. Electrophorèse monodimensionnelle

Les protéines contenues dans chaque extrait sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante, appelée SDS-PAGE (*Sodium*

Dodécyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) afin de les séparer en fonction de leurs masses moléculaires. Les extraits sont dilués dans le tampon de dépôt (LDS4X (*Lithium Dodecyl Sulfate*, Invitrogen) et agent réducteur DTT10X (*Dithiothreitol*, Invitrogen) de manière à avoir une concentration en protéines équivalente entre l'ensemble des échantillons de l'analyse. Ce mélange est chauffé à 100°C pendant 10 minutes. Enfin le même volume (10µg à 15µg de protéines totales dans 10µL) est déposé dans les puits du gel réticulé à 4-12% prêt à l'emploi (*NuPage*, Invitrogen et *Gel Criterion*, Bio-Rad). La migration s'effectue sous une tension constante à 200V pendant 1 heure dans du tampon *MOPS SDS Running Buffer* (Invitrogen).

B.4.c. Western Blot

Après l'électrophorèse monodimensionnelle, les protéines contenues dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose d'une porosité de 0,45µm (*Hybond*, GE HealthCare) sous une tension de 30V pendant 75 minutes. Ensuite, l'efficacité du transfert est vérifiée par une coloration réversible des protéines au Rouge Ponceau (Acide trichloroacétique 3%, Rouge Ponceau 0,2%). Après un lavage au TNT (Tris-HCl 100mM pH=8, NaCl 150mM, Tween20 0,1%), les sites de fixation non spécifique sont saturés par incubation dans une solution de TNT supplémentée de lait ou de BSA (*Bovin Serum Albumin*) à 5% pendant 30 minutes à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire d'intérêt pendant la nuit à 4°C (**Tableau 2**). Le lendemain, les membranes sont rincées avec la solution de TNT (3 fois, 10 minutes) puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (*Vector Laboratories, INC*) pendant 45 minutes à température ambiante. Une 2^{ème} série de rinçages est réalisée. Le complexe antigène/anticorps est révélé en utilisant l'ECL (*GE HealthCare*), agent chimio luminescent. L'empreinte du signal est captée par acquisition au LAS4000 et la quantification des immuno-empreintes est réalisée par mesure de la densitométrie via le logiciel ImageJ (*Scion Image, USA*).

Anticorps	Espèce	Dilution	Applications	Fournisseur
2H2/D11 (AcMet11-Tau)	souris	1/5 000 - 1/1000 - 1/200	WB - ELISA - IHC	Laboratoire
Tau-Cter (Tau totale, 426-441)	lapin	1/10 000 - 1/2000	WB - IHC	Laboratoire
Tau-Nter (Tau totale, 1-19)	lapin	1/10 000 - 1/2000	WB - IHC	Laboratoire
Tau5 (Tau totale, 218-225)	souris	1/1000 - 1/500	WB - ELISA	Invitrogen
Tau P-Ser422	lapin	1/1000	IHC	Laboratoire
Tau P-Ser199	lapin	1/500	IHC	Laboratoire
Tau P-Ser396	lapin	1/10 000	WB	Invitrogen
AT8 (Tau P-Ser202/Thr205)	souris	1/500	IHC	Thermofischer
7C12 (Tau totale, 11-21)	souris	1/1000	ELISA	Laboratoire
ht7	souris	1/100	ELISA	Invitrogen
Bt2	souris	1/100	ELISA	Invitrogen
cyclinD1	lapin	1/1000	WB	Santa Cruz
GAPDH	lapin	1/10 000	WB	Santa Cruz
β actine	souris	1/10 000	WB	Sigma
NSE	lapin	1/50 000	WB	Genetex

Tableau 2 – Tableau présentant l’ensemble des anticorps utilisés pendant cette étude. WB : western blot , IHC : immunohistochimie et dosage ELISA).

B.4.d. Dosage ELISA

Des plaques Nunc 96 puits (*Maxisorp F8; Nunc, Inc.*) sont revêtues pendant une nuit à 4°C avec 100 μ L d’anticorps 2H2/D11 ou Tau5 à la concentration de 1 μ g/mL en tampon carbonate (0.1M Na₂CO₃, 0.1M NaHCO₃, pH 9,6). Le lendemain, les plaques sont saturées à 37°C pendant 1 heure avec le *WASHIX buffer (Innotest hTau Ag kit, Fujirebio)* contenant 0,1% de caséine. Après 3 lavages avec le *WASHIX buffer*, les échantillons protéiques standardisés à 1 μ g/ μ L sont dilués dans le *SAMPL DIL buffer (Innotest hTau Ag kit, Fujirebio)*. Les échantillons protéiques et les anticorps biotinylés (hT7/Bt2, *Innotest hTau Ag kit, Fujirebio*) sont ajoutés, les plaques sont incubés à température ambiante pendant une nuit. Le lendemain, les puits sont rincés 4 fois et incubés avec la streptavidine couplée à la peroxidase à température ambiante pendant 30 minutes. La tétraméthylbenzidine étant le substrat. La réaction est arrêtée par addition d'acide sulfurique et les plaques sont mesurées avec un spectrophotomètre (Multiskan Ascent Thermo Labsystem) à 450 nm.

B.5. Immunohistochimie en visible sur coupes cérébrales murines et humaines

B.5.a. Immunohistochimie sur coupes cérébrales flottantes

Les souris Thy-Tau22 ont été anesthésiées et perfusées transcordialement avec du PBS froid suivi de paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes. Le cerveau est disséqué rapidement, et post-fixé pendant une nuit dans du paraformaldéhyde à 4%. Ensuite, le cerveau est placé dans une solution de PBS/Sucrose 20% pendant 24 et congelé à -80°C jusqu'à l'utilisation. Des sections de 40 µm sont générées à l'aide d'un cryostat (*Leica Microsystems GmbH, Allemagne*). Concernant les sections de tissus cérébraux humains, elles sont fixées et tranchées dans les mêmes conditions que les souris.

Les coupes flottantes sont rincées 3 fois dans le tampon de lavage (PBS/Triton 0,2%) puis les peroxydases endogènes sont inhibées par traitement avec un tampon PBS/H₂O₂ 0,3% pendant 30 minutes. Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués avec du MOM (*Mouse IgG blocking reagent, Vector Laboratories*) ou du sérum de cheval (*Vector Laboratories*) dilué au 1/100 dans du PBS/Triton 0,2% pendant 1 heure à température ambiante. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire d'intérêt (**Tableau 2**) dans le tampon de lavage, sous agitation à 4°C pendant une nuit. Après 3 lavages, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris biotinylé (1/400 dans PBS/Triton 0,2%, *Vector Laboratories*), pendant une heure à température ambiante (des contrôles négatifs de coupes incubées avec l'anticorps secondaire sans pré-incubation avec l'anticorps primaire sont effectués). Les coupes sont ensuite incubées deux heures à température ambiante avec un complexe d'amplification du signal (Kit ABC, *Vector Laboratories*) grâce à une association avidine-biotine-peroxydase (1/400 dans PBS). Le marquage est complété par l'utilisation de 0,5mg/mL de DAB (3,3'diaminobenzidine, *Sigma*) dans 50mM Tris 0,2M, pH 7.6 et contenant 0,075% d'H₂O₂. La DAB s'oxydant en présence de la peroxydase et formant un précipité marron. La réaction est stoppée par un rinçage des coupes à l'eau puis au sérum physiologique 0,9%. Les coupes sont ensuite montées sur des lames *SuperFrost (ThermoScientific)*, après séchage, les noyaux cellulaires sont marqués par incubation dans une solution de crésyl violet 0,5%

(Sigma) pendant 30 secondes puis dans de l'acide acétique 0,5%. Après séchage, les coupes sont déshydratées par des bains d'éthanol de concentration croissante suivi par trois bains de toluène afin de pouvoir réaliser le montage lamelles, grâce à un liquide de montage *Vectamount Permanent* (Vector Laboratories).

B.5.b. Immunohistochimie sur coupes cérébrales en paraffine

Les coupes incluses en paraffine sur des lames sont déparaffinées à l'aide de trois bains de toluène suivi de différents bains d'éthanol de concentration décroissante. Après incubation dans le PBS pendant 5 minutes, les peroxydases endogènes sont inhibées par traitement avec un tampon PBS/H₂O₂ 3% pendant 10 minutes. Un démasquage antigénique est réalisé à l'aide d'un micro-onde (puissance 800W pendant 5 minutes suivi de puissance 500W pendant 15 minutes) dans du tampon EDTA (10mM Tris, 1mM EDTA, Tween20 0,0005%, pH 9). Les coupes sont ensuite incubées dans divers tampons : PBS pendant 10 minutes, PBS/Triton 0,5% pendant 2 fois 10 minutes puis PBS pendant 10 minutes. Les sites non spécifiques sont bloqués avec du sérum de cheval (*Vector Laboratories*) dilué au 1/100 dans du PBS/Triton 0,2% (tampon de lavage) pendant 1 heure à température ambiante. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire d'intérêt (**Tableau 2**) dans le tampon de lavage pendant une nuit à 4°C (exception pour l'anticorps 2H2/D11 dont l'incubation est réalisée à température ambiante). Après 2 lavages puis une incubation dans le PBS pendant 10 minutes, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris biotinylé (1/400 dans PBS/Triton 0,2%, *Vector Laboratories*), pendant une heure à température ambiante (des contrôles négatifs de coupes incubées avec l'anticorps secondaire sans pré-incubation avec l'anticorps primaire sont effectués). La même série de lavage que décrite précédemment est réalisée puis les coupes sont incubées 30 minutes à température ambiante avec le Kit ABC (1/400 dans PBS, *Vector Laboratories*). Le marquage est complété par l'utilisation de 0,5mg/mL de DAB (3,3'diaminobenzidine, *Sigma*) dans 50mM Tris 0,2M, pH 7.6 et contenant 0,075% d'H₂O₂. La réaction est stoppée par un rinçage des coupes à l'eau puis au sérum

physiologique 0,9%. Les noyaux cellulaires sont marqués par incubation dans une solution de crésyl violet 0,5% (*Sigma*) supplémentée d'acide acétique 0,3% pendant 45 secondes. Les coupes sont ensuite déshydratées par des bains d'éthanol de concentration croissante suivi par trois bains de toluène afin de pouvoir réaliser le montage lamelles, grâce à un liquide de montage *Vectamount Permanent* (*Vector Laboratories*).

B.5.c. Analyse des immunohistochimies en visible

Les lames entières sont scannées à l'aide d'un Axioscan (Zeiss Axioscan Z1 slide scanner, associé au microscope) puis les images sont analysées et traitées en utilisant le logiciel Zen.

B.6. Immunofluorescence (expérience de co-marquage)

Les coupes flottantes cérébrales provenant de souris sont rincées 3 fois dans le tampon de lavage (PBS/Triton 0,2%) puis les sites de fixation non spécifiques sont bloqués avec du MOM (*Mouse IgG blocking reagent, Vector Laboratories*) dilué au 1/100 dans du PBS/Triton 0,2% pendant 1 heure à température ambiante. Les coupes sont ensuite incubées avec le premier anticorps primaire (**Tableau 2**) dans le tampon de lavage, sous agitation à 4°C pendant une nuit. Après 3 lavages, les coupes sont incubées avec le second anticorps primaire dans le tampon de lavage, sous agitation à 4°C pendant une nuit. Les coupes sont ensuite lavées et incubées avec les deux anticorps secondaires fluorescents (anti-mouse Alexa468 et anti-rabbit Alexa598, *Invitrogen*) dilués au 1/1000 dans du PBS/Triton 0,2% pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages, les coupes sont montées sur des lames SuperFrost (*ThermoScientific*). Après séchage, le montage des lamelles est réalisé grâce au *Vectashield-DAPI* (*Vector Laboratories*) afin de marquer les noyaux cellulaires.

Les lames sont analysées par imagerie avec un microscope confocal (Zeiss LSM710). Les images présentées ont été obtenues par observation à un grossissement

X40 et correspondent à un ensemble de couches espacées de 1 μ M, dans l'axe z, rassemblées par MIP (Maximum Intensity Projection).

C. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel Prism (*Graph Lab Software Inc, USA*). Les résultats sont exprimés en tant que moyenne avec une erreur standard grâce à l'utilisation du test *one way ANOVA* suivi d'un test *post-hoc LSD Fischer*.

Résultats

Chapitre 1 : Identification d'une nouvelle forme de la protéine Tau tronquée de sa partie amino-terminale et génération d'outils immunologiques

C'est à partir de la caractérisation du profil électrophorétique de Tau dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer que les formes tronquées de la protéine Tau ont été mises en évidence. En effet, l'analyse par électrophorèse monodimensionnelle montrait qu'en plus des différentes isoformes de Tau sous forme monomères et des agrégats de Tau de haut poids moléculaire, il existait des protéines Tau de faibles poids moléculaires et désignées comme formes tronquées de Tau. Parmi cet ensemble de formes tronquées, celles se terminant par les résidus E391 et D421 ont été identifiées et validées à l'aide d'outils immunologiques. Depuis, d'autres sites de troncation ont été identifiés dans la partie carboxy-terminale, notamment le résidu N368 et également dans la partie amino-terminale : les résidus D13 et D21. Au sein du laboratoire, une vingtaine de nouvelles formes tronquées de Tau ont également été identifiées en utilisant une approche protéomique. L'identification de ces espèces de Tau apparaît importante pour comprendre leur implication potentielle dans la physiopathologie associée à la protéine Tau.

Ce premier chapitre des résultats sera d'abord orienté autour de l'identification de la nouvelle forme de Tau tronquée de sa partie amino-terminale (la forme tronquée Met11-Tau) qui a été réalisée lors de mon Master2 recherche, dans le cadre des travaux de thèse du Dr. Derisbourg Maxime (Derisbourg.M, Leghay.C et al., 2015). Par la suite, il sera exposé le choix de l'étude de la Met11-Tau, qui a été principalement motivé par le fait que cette forme tronquée soit également identifiée avec une modification particulière, la N- α -acétylation (Leghay et al., non publié ; Brevet : EP17305355.4, March 28, 2017). Dans une seconde partie, le développement d'outils appropriés pour l'étude de cette forme tronquée Met11-Tau sera exposé : des lignées cellulaires stables à la génération d'un anticorps spécifique de la forme tronquée Met11-Tau N- α -acétylée (AcMet11-Tau).

A. Identification de la nouvelle forme de Tau tronquée de sa partie amino-terminale : Met11-Tau

De manière générale, l'identification des sites de troncation de la protéine Tau est réalisée avec différentes techniques. Par exemple, les formes tronquées se terminant par les résidus N368 et D421 ont été découvertes grâce à l'utilisation des séquences consensus pour certaines protéases et par le développement d'outils immunologiques afin de rechercher leur présence *in situ* (Gamblin et al., 2003b ; Rissman et al., 2004). Une autre approche a été utilisée pour identifier la forme tronquée se terminant par le résidu E391, elle a consisté à isoler à partir des agrégats de Tau les formes tronquées présentes dans ces structures afin d'identifier les sites de clivage par spectrométrie de masse (Wischik et al., 1988b ; Zilka et al., 2012). Au sein du laboratoire, une vingtaine de nouvelles formes tronquées dans la partie amino-terminale ont été identifiées grâce à une approche protéomique permettant l'identification précise du résidu amino-terminal.

A.1. Approche protéomique développée au sein du laboratoire pour l'identification de nouveaux sites de troncation de Tau

Cette approche est détaillée dans la publication Derisbourg et al., 2015, brièvement elle consiste en une première étape d'enrichissement en protéines Tau par immunoprécipitation (IP) en utilisant l'anticorps Tau5 (résidus 218-225, Porzig et al., 2007). Cette IP est suivie d'un marquage des protéines Tau par dansylation ou biotinylation des extrémités amino-terminales, ce marquage a pour but d'augmenter la détectabilité des protéines possédant des fonctions amines primaires libres. Ensuite ces extraits subissent une digestion enzymatique (Trypsine ou Asp-N), ainsi les peptides générés et marqués par la biotine sont passés sur une colonne de chromatographie d'affinité Avidine afin d'enrichir les extraits en peptides marqués au niveau des fonctions amines primaires. Ces extraits sont enfin analysés par LC-MS/MS (*Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry*), ce qui permet d'identifier

des sites de troncation amino-terminaux à partir de peptides marqués sur leur fonction amine primaire (**Figure 22**).

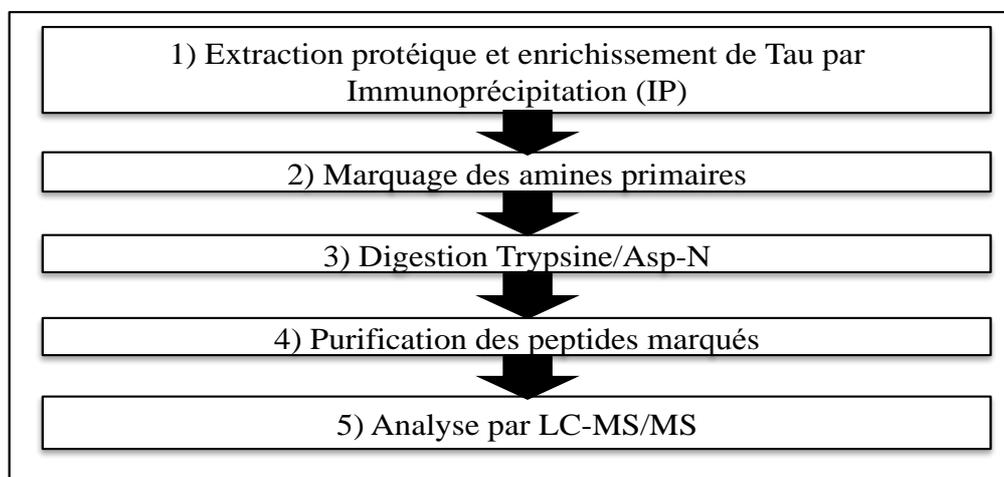


Figure 22 – Approche protéomique développée au sein du laboratoire pour l'identification des sites de clivage amino-terminaux de Tau. Après extraction des protéines à partir de tissus cérébraux humains, une immunoprécipitation (IP) des protéines Tau est réalisée dans le but d'enrichir l'extrait. Après marquage et digestion des protéines, les peptides obtenus sont purifiés et analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectrophotomètre de masse (LC-MS/MS).

A.2. Identification de nouveaux sites de troncation de Tau à partir de lignées cellulaires et de tissus cérébraux humains et intérêt pour la forme tronquée Met11-Tau

Le modèle cellulaire utilisé pour l'identification de nouveaux sites de clivage de Tau est la lignée cellulaire de neuroblastome humain (SH-SY5Y) surexprimant de manière inductible l'isoforme 1N4R (Tau-1N4R) de Tau sous sa forme native et mutée en P301S (Tau-P301S), une mutation décrite dans les DFTP-17 (Bretteville et al., 2009). Après 48 heures d'induction de l'expression de Tau, ces lignées cellulaires ont été analysées par WB afin de caractériser le profil électrophorétique de Tau. Les anticorps Tau-Nter (ciblant les dix-neuf premiers acides aminés de Tau) et Tau-Cter (ciblant les quinze derniers acides aminés de Tau) montrent une expression des protéines Tau-1N4R et Tau-P301S, détectées à un poids moléculaire d'environ 60kDa. Alors qu'aucune expression de Tau n'est détectée dans le Mock (SH-SY5Y possédant le vecteur plasmidique inductible sans transgène). En plus des protéines Tau entières,

les résultats indiquent la présence de nombreuses formes tronquées caractérisées par de faibles poids moléculaires. Il faut remarquer que l'immunoempreinte utilisant l'anticorps Tau-Nter marque beaucoup moins de formes tronquées que celle utilisant l'anticorps Tau-Cter. Ceci suggère que dans ces lignées cellulaires le domaine amino-terminal de Tau est plus sujet à la protéolyse que le domaine carboxy-terminal (**Figure 23**).

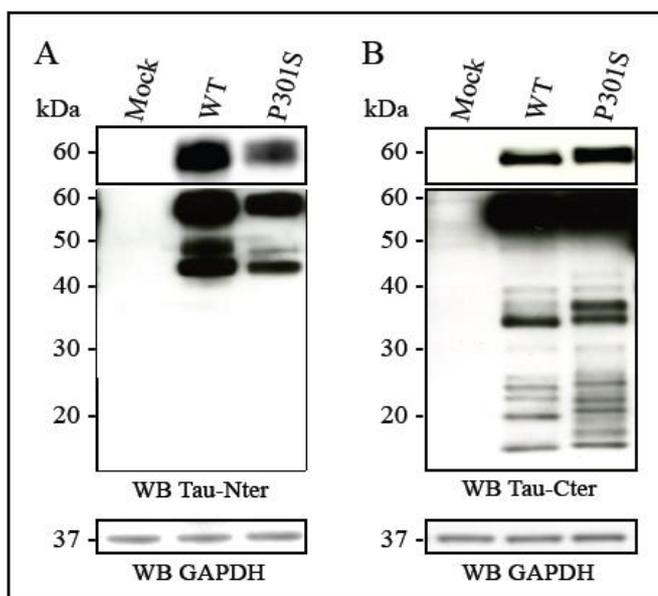


Figure 23 – Caractérisation par Western Blot (WB) de la troncation de la protéine Tau au sein de lignées cellulaires surexprimant Tau. La protéine Tau entière dans les cellules surexprimant Tau1N4R (WT) et Tau-P301S est révélée avec l'anticorps Tau-Nter (A) et Tau-Cter (B). Ces mêmes anticorps révèlent la présence de formes tronquées. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés et l'immunoréactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge. (extrait de la thèse du Dr Derisbourg Maxime).

Après avoir caractérisé ces extraits cellulaires par WB, le protocole d'enrichissement, de marquage et de digestion décrit précédemment est réalisé. Les résultats de la LC-MS/MS à partir des extraits de SH-SY5Y surexprimant Tau montrent la présence de nombreux peptides. Après analyse de ces peptides, cinq d'entre eux ont été retenus car l'extrémité amino-terminale ne pouvait pas résulter d'une digestion enzymatique due à l'expérience : Ala2, Met11, Glu12, Gln33 et Gly134.

Les mêmes expériences ont été réalisées sur le tissu cérébral humain, les échantillons provenant de la Neurobank de Lille. Les tissus avaient été préalablement caractérisés par des études immunohistochimiques afin de les classer selon les stades de Braak (Braak et al., 2011) (**Tableau 3**).

Cas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Age	22	41	49	52	53	61	75	78	62	73	57	56
Délai PM (H)	24	11	34	28	28	20	20	18	10	15	23	26
Neuropathologie (DNF)	SB O	SB II	SB IV	SB V	SB V	SB VI	SB VI					

Tableau 3 – Tableau exposant les caractéristiques des sujets sains et des patients Alzheimer utilisés pour la caractérisation de la troncation de Tau. Sont présentés l'âge de décès, le délai post-mortem (PM) exprimé en heures et les stades de Braak (SB). (extrait de la thèse du Dr Derisbourg Maxime).

Une caractérisation biochimique des protéines Tau a également été réalisée en utilisant les anticorps Tau-Nter et Tau-Cter. Les résultats par WB montrent un profil composé de trois bandes majoritaires comprises entre 45 et 65 kDa, correspondant aux différentes isoformes de Tau portant des niveaux de phosphorylation différents (Sergeant et al., 2008). En plus de ce triplet caractéristique, il faut noter la présence de bandes de hauts poids moléculaires dans les extraits de cerveaux de patients classés dans les stades de Braak tardifs, qui correspondent aux formes agrégées de Tau. Et également, il y a la présence de formes de bas poids moléculaires correspondant aux formes tronquées de Tau. Avec l'anticorps Tau-Nter, ces espèces de Tau sont comprises entre 35 et 45kDa et sont présentes chez les témoins et les patients Alzheimer. A contrario, l'anticorps Tau-Cter montre une immunoréactivité pour les formes tronquées principalement chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer, et qui semble être corrélée avec la présence des espèces de hauts poids moléculaires (**Figure 24**).

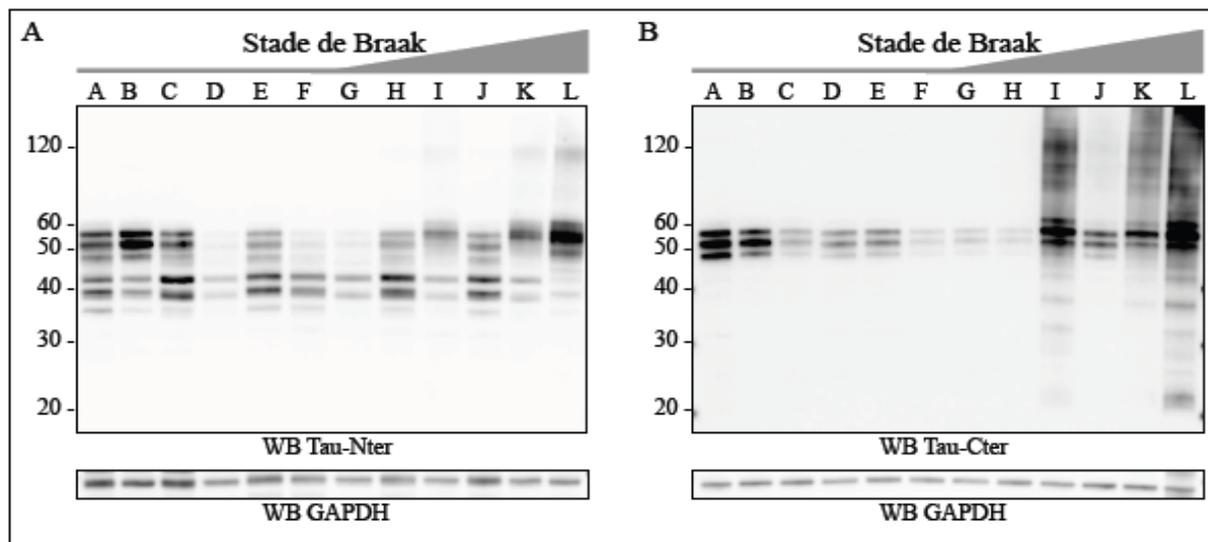


Figure 24 – Caractérisation par Western Blot de la troncation de Tau au sein du tissu cérébral humain. Les extraits protéiques de cortex frontal provenant de sujets sains (A-F) et de sujets Alzheimer (G-L) ont été analysés par immuno-empreinte utilisant les anticorps Tau-Nter (A) et Tau-Cter (B). Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés et l'immunoréactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge. (extrait de la thèse du Dr Derisbourg Maxime).

Le protocole utilisé sur les lignées cellulaires a également été réalisé sur certains tissus cérébraux, notamment au niveau de différentes zones corticales (frontal, pariétal et occipital). Après analyse par LC-MS/MS, vingt-quatre nouveaux sites de troncation répartis sur différentes régions de la protéine Tau ont été identifiés ([Figure 25](#)) (Derisbourg et al., 2015, en annexe).

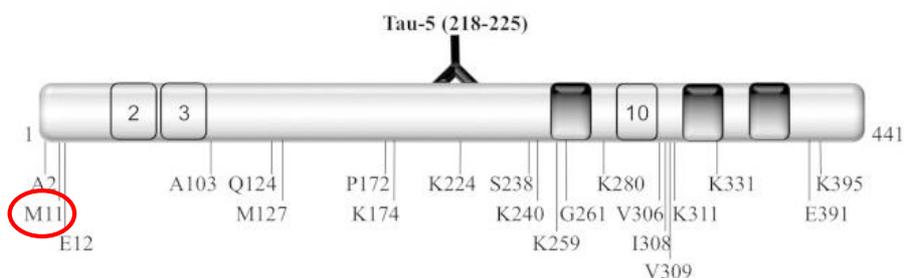


Figure 25 – Localisation des sites de troncation nouvellement identifiés à partir du tissu cérébral humain. Par analyse protéomique, 24 sites de troncation ont été identifiés : leur position est représentée sur l'isoforme de la protéine Tau la plus longue (Tau2N4R). (Derisbourg et al., 2015).

Par la suite, nous avons réalisé des analyses complémentaires sur l'ensemble des données de spectrométrie de masse pour rechercher les modifications post-traductionnelles sur les peptides. Les résultats ont montré que la forme tronquée Met11-Tau que nous avons mise en évidence à la fois dans les cellules surexprimant la protéine Tau1N4R (**Figure 26**) et dans certains échantillons de tissu cérébral humain (**Figure 27**) était également retrouvée sous forme N- α -acétylée (AcMet11-Tau).

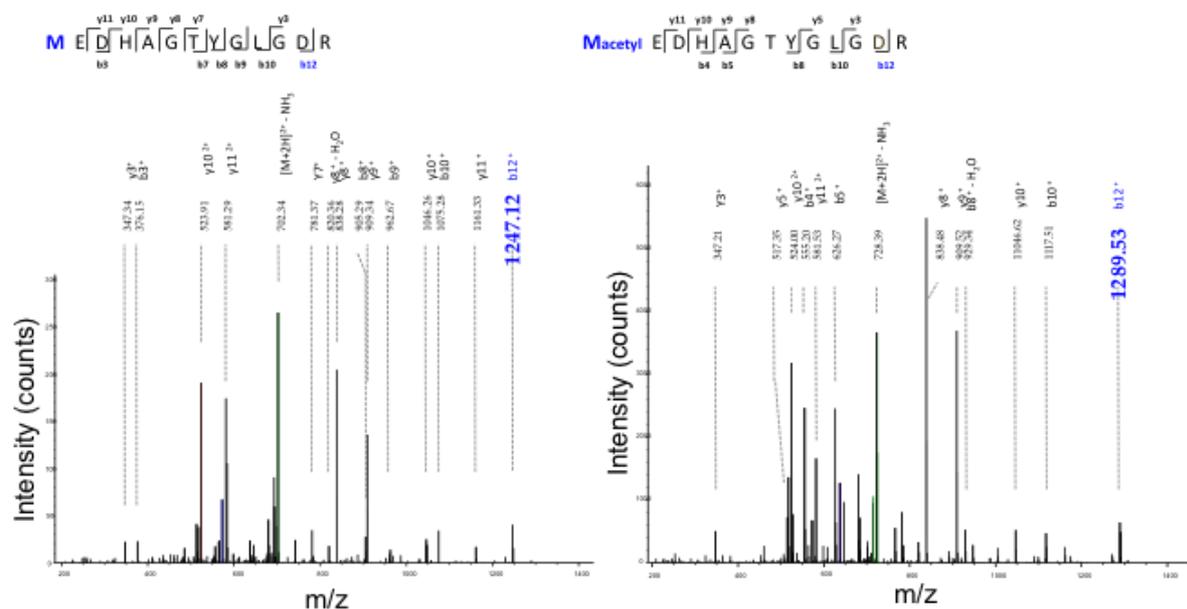


Figure 26 – Spectres de masse MS/MS du peptide Met11-Tau et AcMet11-Tau à partir de la lignée SH-SY5Y Tau. La lignée cellulaire SH-SY5Y Tau a été analysée selon l'approche protéomique développée au sein du laboratoire. L'analyse des spectres de masse montre la présence de la forme tronquée non modifiée (Met11-Tau) et N- α -acétylée (AcMet11-Tau). En effet, l'ajout du groupement acétyl entraîne une augmentation approximative de la masse de 42Da (soustraction des masses molaires des deux peptides $1289,53 - 1247,2 = 42,33\text{Da}$).

En effet, l'analyse des spectres de masse des peptides Met11-Tau montre la présence du groupement acétyl sur la Méthionine 11 de Tau qui révélée par une augmentation de la masse du peptide détecté de l'ordre de 42Da (**Figure 26 et 27**).

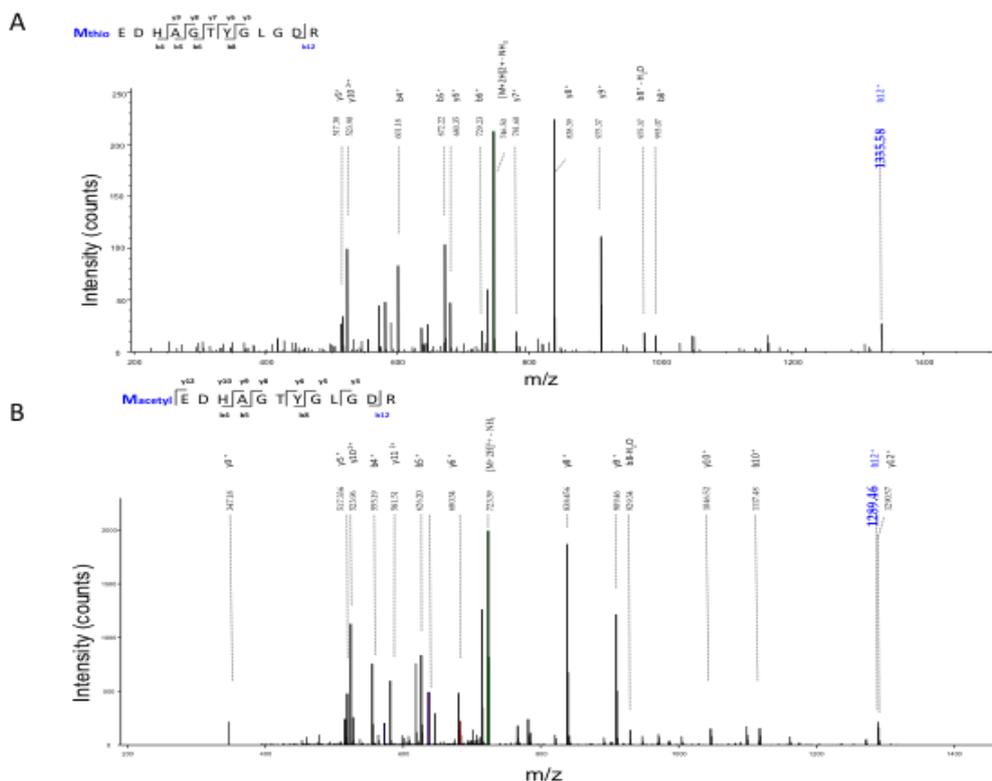


Figure 27 – Spectre de masse MS/MS du peptide Met11-Tau et AcMet11-Tau à partir du tissu cérébral humain. Le tissu cérébral du sujet sain (A) et du patient Alzheimer n°11 (stade de Braak III) (B) décrit dans le Tableau 4 (page119) a été analysé selon l’approche protéomique développée au sein du laboratoire. L’analyse des spectres de masse montre la présence de la forme tronquée non modifiée (Met11-Tau) chez le sujet sain et N- α -acétylée (AcMet11-Tau) chez le patient Alzheimer. En effet, la différence de masse observée entre les deux peptides s’explique par le groupement acétyl (42Da) et le groupement thiol (environ 88Da). (pour le peptide Macetyl la soustraction du groupement acétyl donne une masse molaire de $1289,46 - 42 = 1247,46\text{Da}$, pour le peptide Mthio la soustraction du groupement thio donne une masse molaire de $1335,58 - 88 = 1267,58\text{Da}$).

La présence de cette modification post-traductionnelle jamais décrite pour Tau a motivé notre choix de focaliser la suite de nos études sur la forme Met11-Tau. De plus, l’intérêt de la forme tronquée Met11-Tau réside également dans le fait que : 1) le résidu Met11 se situe dans l’exon1 de la protéine Tau qui est un exon commun aux six isoformes (Buée et al., 2000) ; 2) des changements en acides aminés dans la partie amino-terminale de Tau sont associés à des Tauopathies (Hayashi et al., 2002 ; Poorkaj et al., 2002) ; supposant ainsi que la délétion des 10 premiers acides aminés de Tau pourrait avoir des conséquences fonctionnelles et ou physiopathologiques.

Ainsi, les analyses par LC-MS/MS ont montré que la forme tronquée Met11-Tau nouvellement identifiée était retrouvée sous une forme non modifiée (Met11-Tau) et sous une forme N- α -acétylée (AcMet11-Tau). Cette approche protéomique a permis de mettre en évidence une nouvelle modification sur la protéine Tau, en effet une seule étude relate la N- α -acétylation de Tau sur le résidu Ala2 (Hasegawa et al., 1992); la N- α -acétylation de Ala2 de Tau a été également détectée par notre approche protéomique (Derisbourg et al., 2015). Mais cette approche possède des limites expérimentales ; en plus du manque de reproductibilité, elle est exclusivement qualitative et ne permet pas d'exclure l'absence d'un site de clivage ou d'une autre modification. Il était donc nécessaire de générer des outils appropriés à l'étude de la forme tronquée AcMet11-Tau.

B. Développement d'outils appropriés à l'étude de l'AcMet11-Tau

B.1. Génération et caractérisation de lignées cellulaires stables et inductibles

Afin de caractériser la forme tronquée Met11-Tau, des vecteurs d'expression (plasmide pcDNA4/To) contenant les séquences d'ADNc de la forme tronquée et de la protéine Tau entière ont été développés. Puisque le site de troncation Met11 est localisé dans l'exon1 qui est un exon commun à toutes les isoformes de Tau, nous avons développé les vecteurs d'expression Met11-Tau dans le cadre des 2 isoformes majoritaires de Tau: l'isoforme 1N4R (contenant l'exon2 et l'exon10) et l'isoforme 1N3R (contenant uniquement l'exon2). Ainsi, les vecteurs d'expression plasmidiques codant pour la forme tronquée Met11-Tau dans ces deux contextes d'isoformes ainsi que la protéine Tau entière également dans ces deux contextes ont été générés. Pour la suite des études, la distinction entre les deux contextes sera réalisée pour la forme tronquée : Met11-Tau4R (basée sur l'isoforme 1N4R de Tau) et Met11-Tau3R (basée sur l'isoforme 1N3R de Tau).

Ces vecteurs d'expression plasmidiques ont été transfectés stablement dans la lignée cellulaire de neuroblastome humain SH-SY5Y/TR exprimant le répresseur à la tétracycline (TetR). En effet, les séquences d'ADNc ont été insérées dans le vecteur

pcDNA4/To qui possède une séquence opératrice de l'opéron tétracycline (TetO₂) en amont du promoteur. Ainsi, le TetR exprimé de manière constitutive dans les cellules SH-SY5Y/TR se fixe sur la séquence TetO₂ ce qui a pour conséquence d'empêcher la transcription du gène d'intérêt. Après sélection des cellules ayant intégrées les transgènes codant pour la protéine Tau entière (Tau1N4R et Tau1N3R) ainsi que pour la forme tronquée Met11-Tau (Met11-Tau4R et Met11-Tau3R), l'expression protéique a été analysée par WB (**Figure 28**).

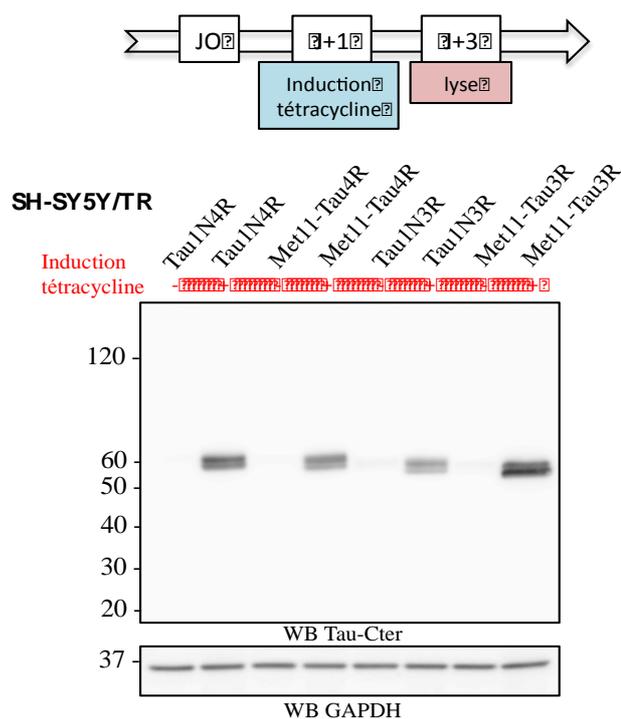


Figure 28 – Profil d'expression de la protéine Tau entière et de la forme tronquée Met11-Tau dans le contexte de deux isoformes de Tau. Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de l'expression des transgènes après 48h d'induction avec la tétracycline dans les lignées cellulaires SH-SY5Y stables et inductibles. L'immuno-empreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter montre l'expression des protéines Tau1N4R et Tau1N3R ainsi que les formes tronquées Met11-Tau4R et Met11-Tau3R. Cette expression n'est présente que dans les cellules traitées à la tétracycline. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés et l'immunoréactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

L'induction de l'expression est réalisée par l'ajout de tétracycline dans le milieu de culture des cellules pour une durée de 48 heures. Les résultats par immunopempreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter confirment l'expression des différentes espèces de Tau aux masses moléculaires attendues : la protéine Tau1N4R est observée à environ 58kDa, la protéine Tau1N3R à 54kDa et les formes tronquées Met11-Tau possédant des poids moléculaires plus faibles. Il faut noter que l'expression des différentes espèces de Tau n'est détectée que lorsque la tétracycline est ajoutée ; il n'existe ainsi pas de fuite importante du système dans ces lignées cellulaires stables inductibles.

Après avoir réalisé cette caractérisation de base, les SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R ont été analysées en LC-MS/MS. Cette analyse a été entreprise dans le but de savoir si la forme tronquée Met11-Tau était retrouvée N- α -acétylée dans cette lignée nouvellement générée. Après analyse des spectres de masse, les résultats ont montré la présence de la forme tronquée Met11-Tau et également de la forme tronquée AcMet11-Tau (résultats non montrés). Ainsi, ces résultats ont permis de confirmer que le modèle cellulaire généré peut être utilisé pour l'étude de la N- α -acétylation de Met11-Tau. Cependant, cette méthode protéomique est qualitative et il est impossible de distinguer le ratio AcMet11-Tau/Met11-Tau. Afin de détecter, quantifier et entreprendre les études fonctionnelles de l'AcMet11-Tau il fallait donc développer un outil spécifique de cette forme tronquée.

B.2. Génération d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine AcMet11-Tau

A la vue de la nécessité d'un outil spécifique de détection spécifique de la forme AcMet11-Tau, l'équipe a décidé de générer un anticorps monoclonal. Cette génération a été réalisée sur la base de la technologie des hybridomes qui a été mise au point en 1975 par Georges Köhler et César Milstein qui ont fabriqué les premiers anticorps monoclonaux (Köhler and Milstein, 1975). Cette découverte leur a d'ailleurs valu le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984.

La génération d'un anticorps dirigé contre AcMet11-Tau a été réalisée avec l'aide de la société Agro-Bio (La Ferté Saint Aubin) et se compose de cinq étapes majeures : 1) l'immunisation des souris et le contrôle de la réponse immunitaire ; 2) la fusion des lymphocytes de la rate des souris avec les cellules cancéreuses afin d'obtenir des hybridomes ; 3) le clonage et le « screening » des hybridomes et 4) la purification et la caractérisation des anticorps issus de l'hybridome retenu.

B.2.a. Immunisation animale et contrôle de la réponse immunitaire

Dans le cadre de ce projet cinq souris ont été immunisées à différents jours (J0, J14, J45 et J63) avec le peptide AcMet11-Tau (<N- α -acétyl> MEDHAGTYGLGC-KLH) correspondant à la séquence de Tau allant de la Met11 à la Gly21. Deux prélèvements immuns à J24 et J56 ont été récupérés et analysés par dosage ELISA dans le but de contrôler la réponse immunitaire de chaque souris immunisée. Les résultats à J24 montrent une absence de réponse immune (données non présentées). A contrario, les prélèvements sanguins à J56 montrent différents résultats, il est à noter que les analyses ne sont réalisées que sur quatre souris dû au décès inexplicable de l'une d'entre elles. La présence d'anticorps dans le sérum a été analysée par ELISA indirect en utilisant les peptides libres AcMet11-Tau et Met11-Tau (MEDHAGTYGLGC). Des dilutions en série des prélèvements sériques sont utilisées pour réaliser le titrage. Les résultats montrent un titre plus faible pour le peptide Met11-Tau par rapport au peptide AcMet11-Tau (**Figure 29**). Par exemple, la souris n°1 présente un titre de 1/700 pour le peptide Met11-Tau et un titre de 1/48000 pour le peptide AcMet11-Tau. L'analyse peptide par peptide montre que les souris n°2 et 4 possèdent une bonne réponse pour le peptide Met11-Tau alors que les souris n°1 et 3 possèdent une réponse faible. Ainsi, pour le peptide AcMet11-Tau ce sont les souris n°1 et 4 qui possèdent le meilleur titre. La souris n°1 a donc été choisie pour réaliser l'étape suivante de fusion car elle présente le titre le plus élevé pour le peptide AcMet11-Tau (proche du titre optimal de 1/50000) et un faible titre pour le peptide Met11-Tau.

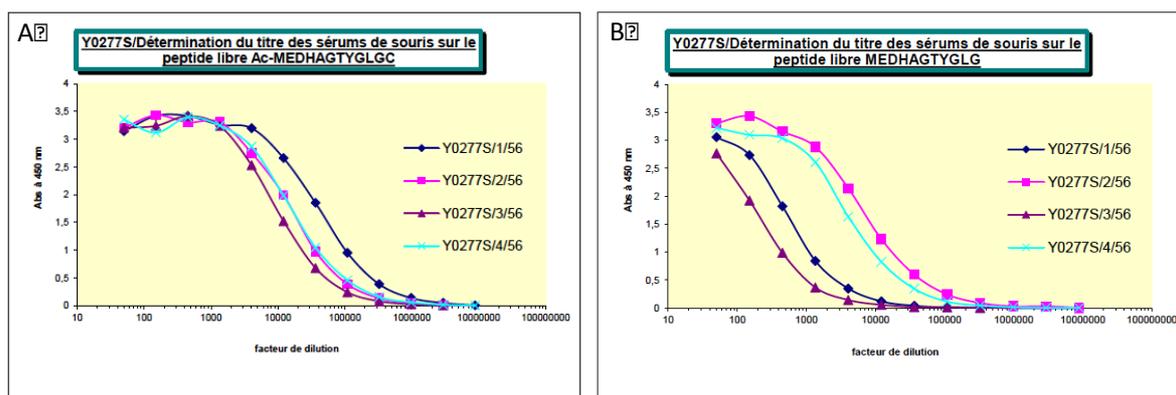


Figure 29 – Mesure du titre de la réponse immunitaire suite à l’immunisation avec le peptide AcMet11-Tau. (A) Figure représentative du titrage sérologique de 4 souris immunisées vis-à-vis du peptide AcMet11-Tau (B) Figure représentative du titrage sérologique de 4 souris immunisées vis-à-vis du peptide Met11-Tau.

B.2.b. Fusion et obtention des hybridomes

Après avoir sélectionné la souris la plus immunoréactive, le but est de fusionner chaque cellule sécrétrice d’anticorps avec une cellule de lignée humaine « immortalisée » qui possède la particularité de se diviser indéfiniment. Après récupération de la rate, les splénocytes sont fusionnés avec les cellules murines de myélome NS1 dans un ratio de 5 splénocytes pour 1 cellule myélomateuse. Ces cellules cancéreuses possèdent une double mutation qui a pour conséquence : 1) une perte de capacité à sécréter des immunoglobulines et 2) l’incapacité à produire l’enzyme *Hypoxanthine Guanosine PhosphoRibosyl Transferase* (HGPRT) qui intervient dans la voie de synthèse de secours des acides nucléiques. Ainsi, la sélection des cellules fusionnées également appelées hybridomes met à profit ce déficit enzymatique. En effet, la sélection est réalisée par ajout dans le milieu d’*Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine* (HAT) qui inhibe la voie de synthèse des acides nucléiques *de novo*. Dans le cadre de ce projet, après sélection il a été obtenu 635 hybridomes.

B.2.c. « Screening » et Clonage des hybridomes

Les hybridomes sont d'abord vérifiés par la technique d'ELISA puis validés par la technique de WB. Tous les résultats obtenus ne sont pas présentés mais voici quelques exemples d'hybridomes testés. Dans un premier temps, la présence d'anticorps sécrétés dans le surnageant est analysée par ELISA indirect en utilisant les peptides libres AcMet11-Tau, Met11-Tau et AcTau (<N- α -acétyl> MAEPRQEFVMDHAGTYGLG), ce dernier peptide correspond à la protéine Tau entière N- α -acétylée sur la première Met. L'utilisation de ces 3 peptides permet de détecter les anticorps qui reconnaissent la Met11 acétylée de Tau mais pas la Met11 non modifiée ni une méthionine acétylée dans un contexte d'acides aminés différent de celui de la méthionine 11 de Tau. Les résultats des ELISA montrent différents profils entre les hybridomes. Par exemple, les hybridomes 12E11 et 5C2 montrent une densité optique équivalente pour le peptide AcMet11-Tau, Met11-Tau et AcTau ce qui signifie que les anticorps sécrétés par ces hybridomes ne sont pas spécifiques de la forme tronquée AcMet11-Tau. En revanche, l'hybridome 2H2 montre une densité optique élevée pour le peptide AcMet11-Tau (3,011) et de faibles densités optiques pour les peptides Met11-Tau (0,176) et AcTau (0,195) (**Figure 30**).

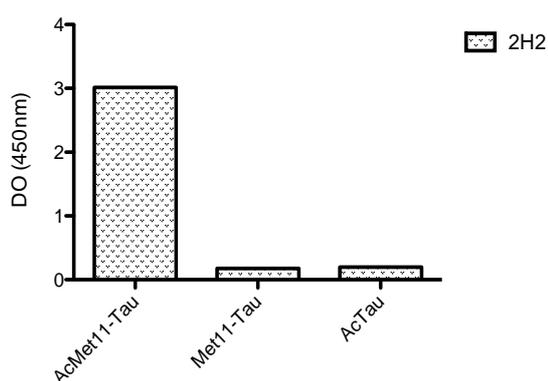


Figure 30 – Screening des hybridomes par la méthode de dosage ELISA indirect. Figure représentative de l'analyse du surnageant de l'hybridome 2H2 par dosage ELISA indirect. L'analyse montre une densité optique élevée pour le peptide AcMet11-Tau et de faibles densités optiques pour les peptides Met11-Tau et Ac-Tau.

L'hybridome 2H2 est donc plus spécifique de la forme tronquée AcMet11-Tau que ceux testés précédemment. Afin de confirmer ces résultats, une autre méthode, le WB a été utilisée. Pour cela, des extraits de cellules SH-SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R non induites et induites pendant 48 heures ont été utilisés.

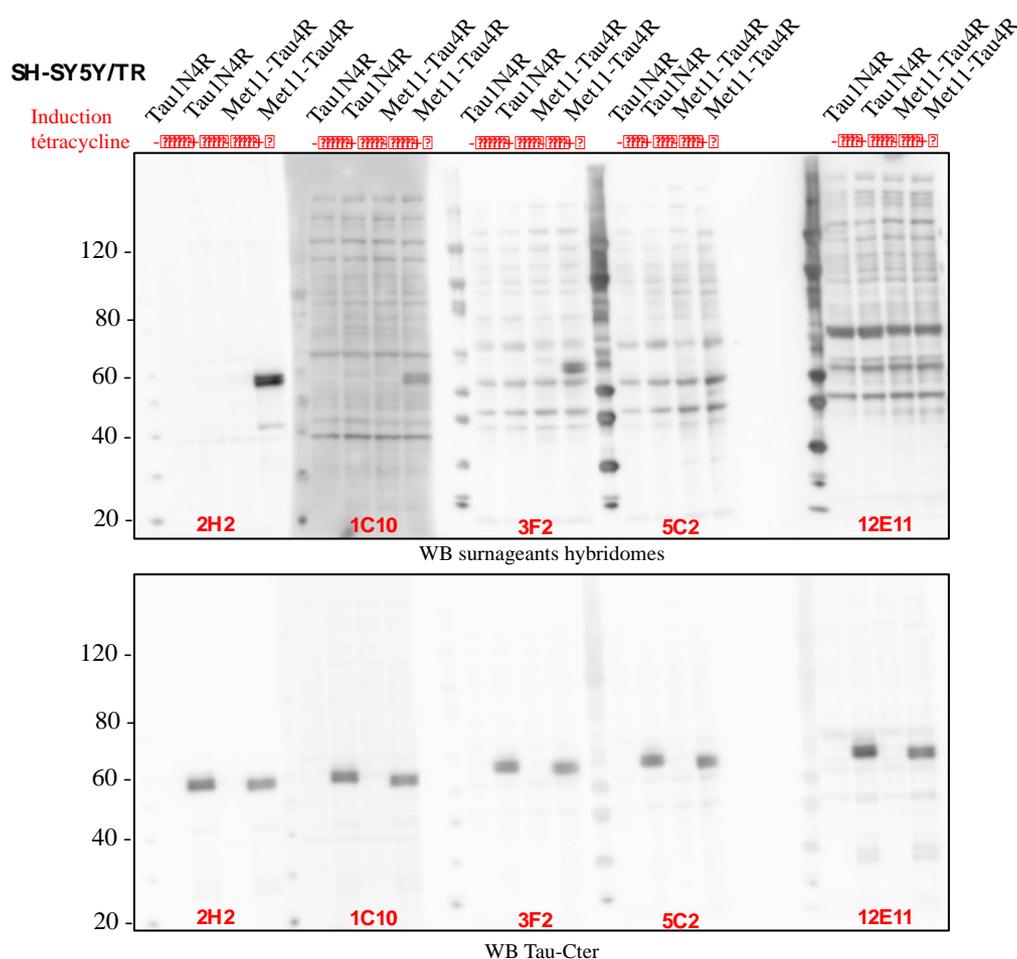


Figure 31 – Validation des hybridomes par la méthode de Western Blot. Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte du surnageant de différents hybridomes sur les extraits protéiques des lignées cellulaires SH-SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R après 48 heures d'induction de l'expression des transgènes. Les surnageants des hybridomes 5C2 et 12E11 ne montrent aucune immunoréactivité pour la forme tronquée AcMet11-Tau présente dans la lignée SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R. Alors que les surnageants des hybridomes 2H2, 1C10 et 3F2 montrent une immunoréactivité. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés et l'immuno-empreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter confirme la bonne expression des transgènes.

Les résultats par immuno-empreinte utilisant les surnageants des hybridomes 12E11 et 5C2 montrent l'absence de marquage spécifique de la forme tronquée AcMet11-Tau dans la lignée cellulaire SY5Y/TR Met11-Tau4R induite. A contrario, une immunoréactivité unique est observée avec le surnageant de l'hybridome 2H2 dans ces cellules. De plus, aucun marquage n'est observé dans les cellules exprimant la protéine Tau1N4R (**Figure 31**). L'utilisation de l'anticorps Tau-Cter confirme l'expression des transgènes dans les lignées cellulaires induites.

A la vue de ces résultats, le clonage de l'hybridome 2H2 a été entrepris. Le clonage est réalisé sous le principe de la dilution en série de manière à partir d'une suspension cellulaire et d'arriver à une seule cellule par puits. Les clones ont été ensuite analysés de la même manière que décrite précédemment. Les résultats du dosage ELISA indirect ont montré que tous les clones possèdent une forte densité optique (d'environ 2,1) pour le peptide AcMet11-Tau alors qu'aucune activité n'est observée pour les peptides AcTau et Met11-Tau (résultats non montrés). La confirmation par WB a également montré une immunoréactivité identique pour tous les hybridomes en incubant le surnageant de chacun avec les extraits des lignées cellulaires stables et inductibles (résultats non montrés). En regroupant tous ces résultats, nous avons retenu le clone 2H2/D11 pour produire et purifier l'anticorps monoclonal dirigé contre la forme tronquée AcMet11-Tau. De plus, l'isotypage de l'anticorps a également été réalisé, il est de la classe d'immunoglobulines IgG2a et se compose de chaînes légères Kappa.

B.2.d. Caractérisation de l'anticorps monoclonal dirigé contre l'AcMet11-Tau

L'anticorps monoclonal purifié ainsi obtenu est dénommé 2H2/D11, il cible la forme tronquée AcMet11-Tau. Afin de pouvoir l'utiliser dans des conditions optimales, en WB notamment, plusieurs tests ont été réalisés pour déterminer les conditions d'utilisation et de conservation (résultats présentés en annexe). Ainsi, pour une meilleure conservation l'ajout de glycérol n'est pas toléré par l'anticorps et pour son utilisation il est à diluer au 1/5000 dans un saturant TNT-BSA5%. Une fois ces

conditions mises au point, il était important de tester la spécificité de l'anticorps 2H2/D11 vis-à-vis de la forme tronquée AcMet11-Tau. Pour cela, un test d'immunodéplétion sur peptides a été réalisé. Il consiste à pré-incuber l'anticorps 2H2/D11 avec soit le peptide AcMet11-Tau ou soit le peptide Met11-Tau (peptides utilisés pour « screening » des hybridomes) pendant une nuit à 4°C. Après cette pré-incubation les anticorps sont utilisés pour l'analyse par WB des cellules SH-SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R.

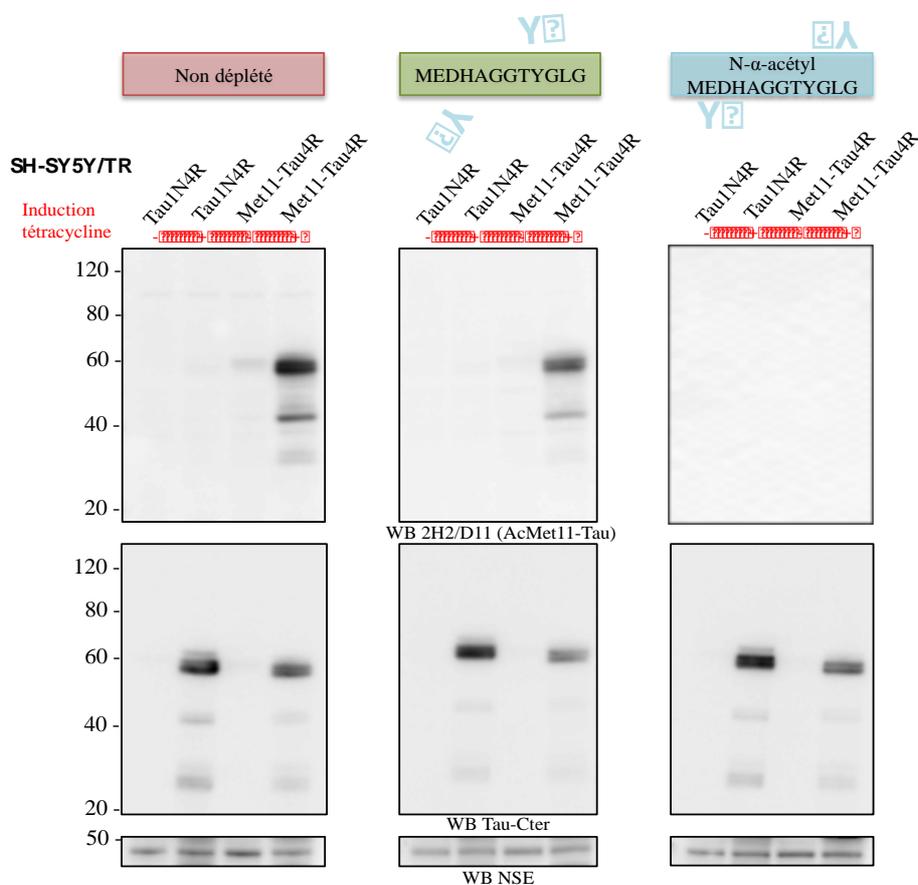


Figure 32 – Validation de la spécificité de l'anticorps monoclonal 2H2/D11. Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de l'expression des transgènes après 48h d'induction avec la tétracycline dans les lignées cellulaires SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R après immunodéplétion de l'anticorps 2H2/D11. Dans les conditions non déplétée et déplétée avec le peptide Met11-Tau, l'immunoréactivité de la forme tronquée AcMet11-Tau est retrouvée au sein de la lignée SY5Y/TR Met11-Tau4R. Dans la condition déplétée avec le peptide AcMet11-Tau, l'immunoréactivité de la forme tronquée AcMet11-Tau est perdue. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés, l'immuno-empreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter confirme la bonne expression des transgènes et l'immunoréactivité de la NSE est utilisée comme contrôle de charge.

Les résultats montrent que l'anticorps 2H2/D11 est bien neutralisé par le peptide AcMet11-Tau et qu'il n'est plus disponible pour permettre l'immunoempreinte de l'AcMet11-Tau dans les SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R (**Figure 32**). Alors qu'au contraire, avec le peptide Met11-Tau et dans la condition non déplétée, l'anticorps 2H2/D11 est toujours disponible pour l'immunoempreinte de la forme tronquée AcMet11-Tau. Ainsi, par cette expérience d'immunodéplétion l'anticorps 2H2/D11 est validé comme spécifique de la forme tronquée AcMet11-Tau.

L'obtention de cet anticorps monoclonal dirigé contre la forme tronquée Ac-Met11-Tau nouvellement identifiée est donc un réel atout pour réaliser les études fonctionnelles et les études d'association de la protéine AcMet11-Tau avec la pathologie Tau.

Chapitre 2 : Pertinence de la forme tronquée AcMet11-Tau par rapport à la pathologie Tau

Comme décrit précédemment, de nombreuses formes tronquées de Tau, dont la plupart ne sont pas encore identifiées de manière précise, sont retrouvées dans la maladie d'Alzheimer et au sein d'autres Tauopathies. Afin d'étudier le rôle de ces espèces de Tau avec la pathologie, des études réalisées dans les modèles transgéniques ont montré que les formes tronquées se terminant par les résidus E391 et D421 acquéraient une propriété de fibrillogenèse rapide et reproduisaient la pathologie Tau (de Carlignon et al., 2010 ; McMillan et al., 2011 ; Zilka et al., 2006). De plus, au sein du tissu cérébral humain, l'apparition de ces formes tronquées est corrélée avec l'évolution de la pathologie Tau (Basurtos-Islas et al., 2008 ; Garcia-Sierra et al., 2008).

Ainsi, l'intérêt de ce deuxième chapitre de résultats est d'établir si il y a ou non une association de la forme tronquée AcMet11-Tau avec la pathologie Tau. En effet, via notre approche protéomique qui présente des limites de sensibilité et de reproductibilité, l'identification de la forme AcMet11-Tau a été réalisée dans le tissu cérébral d'un patient Alzheimer de stade Braak III. Mais il n'est pas à exclure que cette forme tronquée puisse être retrouvée chez les sujets sains. Afin de parfaire la caractérisation de la forme AcMet11-Tau, nous avons utilisé l'anticorps 2H2D11, que nous avons généré et dont nous avons validé la spécificité, dans des approches immunologiques pour analyser des tissus cérébraux murins issus de modèles transgéniques de pathologie Tau et des tissus cérébraux humains provenant de patients atteints de différentes Tauopathies, notamment la maladie d'Alzheimer, ainsi que de sujets sains. Les échantillons humains sont obtenus auprès de la Lille NeuroBank (CHU de Lille).

A. Analyse du tissu cérébral humain et murin : association potentielle de AcMet11-Tau avec la maladie d'Alzheimer ?

A.1. Analyse du tissu cérébral humain par Western Blot

Une caractérisation biochimique basée sur l'utilisation en Western Blot des anticorps Tau-Nter, Tau-Cter et Tau phosphorylée en Ser396 a été réalisée à partir des protéines extraites du cortex temporal de sept sujets sains et neufs patients Alzheimer présentant différents stades de Braak ([Tableau 4](#)).

Cas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Age	29	61	75	80	22	76	82	76	84	86	76	62	77	73	57	72
Délai PM (H)	20	ND	7	24	24	14	48	3	18	10	10	10	6	22	23	6
Neuropathologie (DNF)	SB 0	SB V	SB IV	SB VI	SB III	SB V	SB V	SB VI	SB VI	SB VI						

Tableau 4 – Tableau exposant les caractéristiques des sujets sains et des patients Alzheimer utilisés pour analyser la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau par WB. Sont présentés l'âge de décès, le délai post-mortem (PM) exprimé en heure et les stades de Braak (SB).

Les résultats de l'analyse par WB avec les anticorps Tau-Nter et Tau-Cter montrent le profil électrophorétique caractéristique des protéines Tau : trois bandes majoritaires sont présentes entre 45 et 65 kDa, elles correspondent aux différentes isoformes de Tau en fonction de leur état de phosphorylation ([Figure 33](#)). Concernant les bandes de hauts poids moléculaires correspondant aux formes agrégées de Tau, elles ne sont présentes que chez les patients Alzheimer alors que pour les bandes de bas poids moléculaires, elles sont présentes chez les sujets sains et Alzheimer. L'analyse par WB avec l'anticorps qui reconnaît les protéines Tau phosphorylées en Ser396 a permis de réaliser une classification des patients Alzheimer en fonction de l'évolution de la pathologie, selon le niveau de phosphorylation. En effet, la phosphorylation sur la Ser396 est de plus en plus marquée en fonction de l'avancée des stades de Braak.

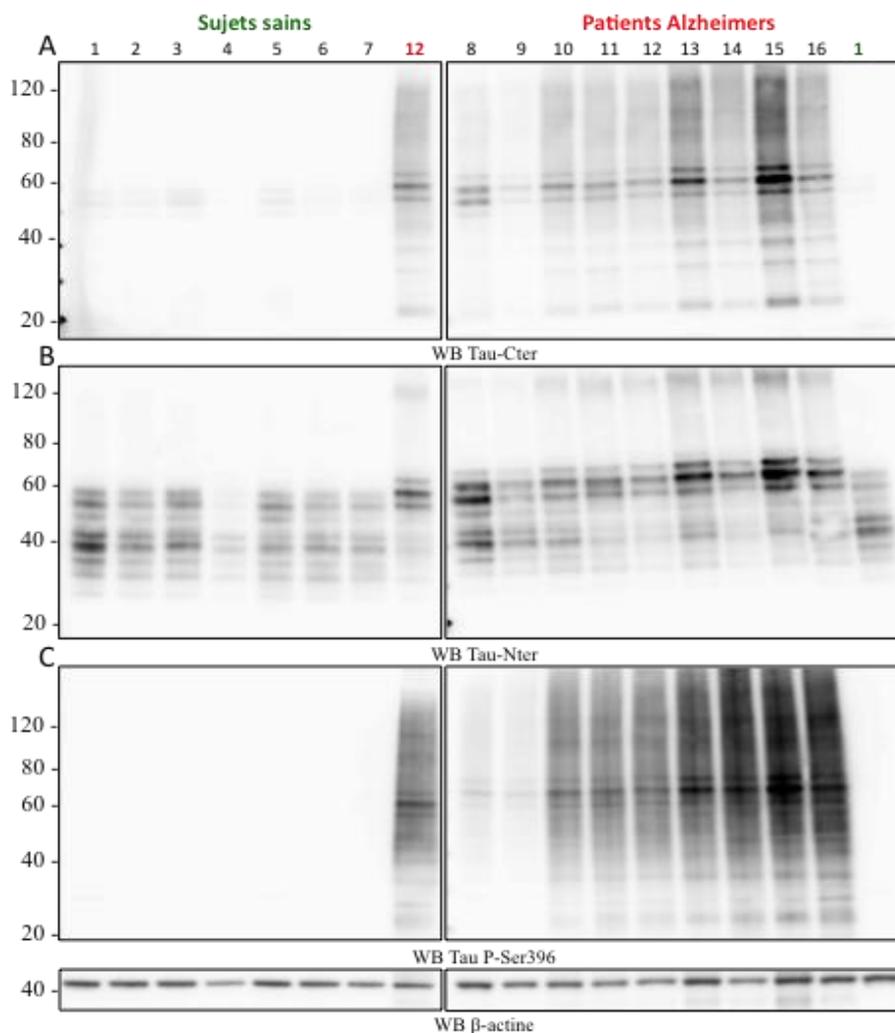


Figure 33 – Caractérisation par WB du profil électrophorétique des protéines Tau provenant du tissu cérébral de sujets sains et patients Alzheimer. Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de l'expression des protéines Tau au sein du cortex temporal de 7 sujets sains (1-7) et 9 patients Alzheimers (8-16) en utilisant les anticorps Tau-Cter (A) et Tau-Nter (B). L'immunoempreinte utilisant l'anticorps Tau P-Ser396 (C) a permis de réaliser une classification en fonction de l'évolution de la pathologie Tau. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés et l'immunoréactivité de la β -actine est utilisée comme contrôle de charge.

Après avoir caractérisé biochimiquement ces tissus cérébraux humains, l'évaluation de l'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau a été entreprise par Western Blot, en utilisant des quantités protéiques croissantes de 10, 20 et 50 microgrammes, l'analyse par WB en utilisant l'anticorps monoclonal dirigé contre l'AcMet11-Tau n'a pas permis de mettre en évidence la présence de cette forme tronquée au sein des tissus cérébraux utilisés, même dans l'échantillon qui a servi à

l'identification de cette forme de Tau par protéomique (patient n°11). En effet, l'immunoréactivité observée correspond aux cellules SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R qui exprime l'AcMet11-Tau lors de l'induction de l'expression protéique, utilisées comme contrôle positif (**Figure 34**). Cependant, cette absence de détection peut être liée au seuil de détection trop faible de la technique de WB. En effet, il faut rappeler que l'AcMet11-Tau a été identifiée à l'aide d'une approche protéomique à partir d'échantillons enrichis par IP en protéines Tau. De plus, les formes tronquées de Tau sont des espèces qui doivent être proportionnellement peu fréquentes par rapports aux autres formes de Tau. A la suite de ces résultats, nous avons réalisé les analyses des tissus cérébraux par des techniques plus sensibles.

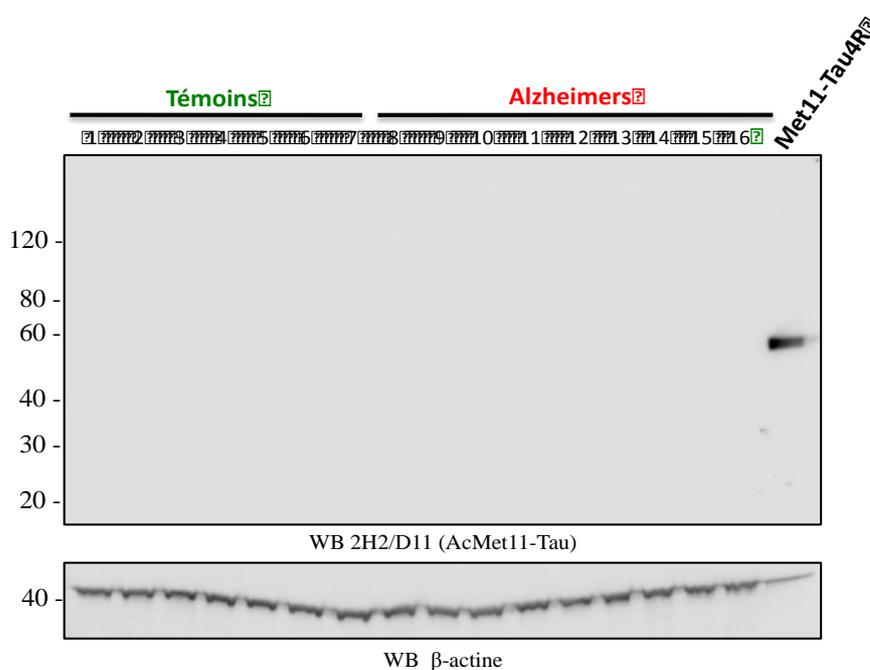


Figure 34 – Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein du tissu cérébral humain par la technique de Western Blot. Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de l'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein du cortex temporal de 7 sujets sains (1-7) et 9 patients Alzheimers (8-16) en utilisant l'anticorps 2H2/D11. L'analyse montre l'absence d'immunoréactivité dans le tissu cérébral analysé et une immunoréactivité positive dans la lignée cellulaire SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R dont les extraits ont été utilisés comme contrôle positif. Cinquante microgrammes de protéines extraites sont déposés pour les échantillons humains contre dix microgrammes pour la lignée cellulaire SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R. L'immunoréactivité de la β -actine est utilisée comme contrôle de charge.

A.2. Analyse du tissu cérébral murin

A.2.a. Par la méthode d'immunohistochimie

Les études d'association sur le tissu cérébral par la technique d'immunohistochimie ont débuté sur le tissu cérébral murin. En effet, des mises au point étaient nécessaires avant d'entreprendre les études sur le tissu cérébral humain. Pour cela, des coupes flottantes de souris Wild-Type (WT) et Thy-Tau22 ont été utilisées. Le modèle transgénique murin Thy-Tau22 qui est disponible au sein de l'équipe a été généré sur la base de mutations présentes sur le gène MAPT chez les patients DFTP-17. En effet, ces souris expriment sous le promoteur neuronal Thy1.2 la protéine Tau1N4R humaine mutée sur deux sites favorisant son agrégation (G272V et P301S) (Schindowski et al., 2006) (**Figure 35**).

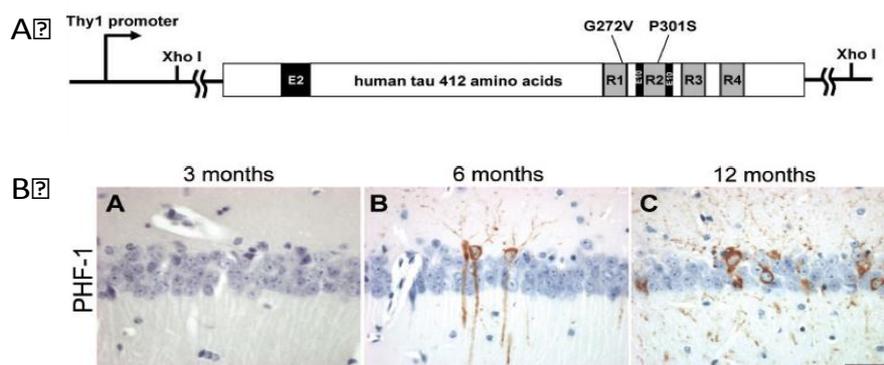


Figure 35 – Le modèle murin transgénique Thy-Tau22. (A) Schéma de la construction du transgène : ce modèle transgénique surexprime l'isoforme Tau1N4R humaine mutée en deux sites (G272V et P301S) situés dans l'exon10. L'expression du transgène étant sous contrôle du promoteur neuronal Thy1.2. (B) Immunohistochimie réalisée avec l'anticorps PHF-1 sur l'hippocampe de souris Thy-Tau22 âgées de 3, 6 et 12 mois. L'immunoréactivité PHF-1 (P-Ser396/404) montre un marquage dans la CA1 de type neurones en DNF dès l'âge de 6 mois. (extrait de Schindowski et al., 2006).

Ce modèle présente l'avantage de développer une pathologie Tau progressive : dès l'âge de 3 mois, de la DNF est observée dans la région Corne d'Ammon1 (CA1) de l'hippocampe puis elle s'étend dans la CA3, le gyrus denté et le cortex. La DNF s'accompagne d'une phosphorylation anormale et d'une hyperphosphorylation de la protéine Tau sur de nombreux résidus, notamment sur les résidus Ser396/404 reconnus

par l'anticorps PHF-1. En effet, lors de l'analyse par immunohistochimie de coupes flottantes de souris Thy-Tau22 à 3, 6 et 12 mois et en utilisant l'anticorps PHF-1, une immunoréactivité croissante du nombre de neurones dans la CA1 est observée (**Figure 35**). Parallèlement à ce développement progressif de la pathologie Tau, ce modèle développe une altération de la mémoire spatiale sans déficits moteurs (Van der Heugd et al., 2011). L'immunohistochimie en visible utilisant l'anticorps 2H2/D11 reconnaissant spécifiquement la forme tronquée AcMet11-Tau a été réalisée sur des souris WT et Thy-Tau22 à 6, 9 et 12 mois. Les résultats montrent une présence de la forme tronquée AcMet11-Tau chez la souris Thy-Tau22, notamment au niveau de la OCA1 alors qu'aucun marquage n'est détecté chez la souris WT (**Figure 36**).

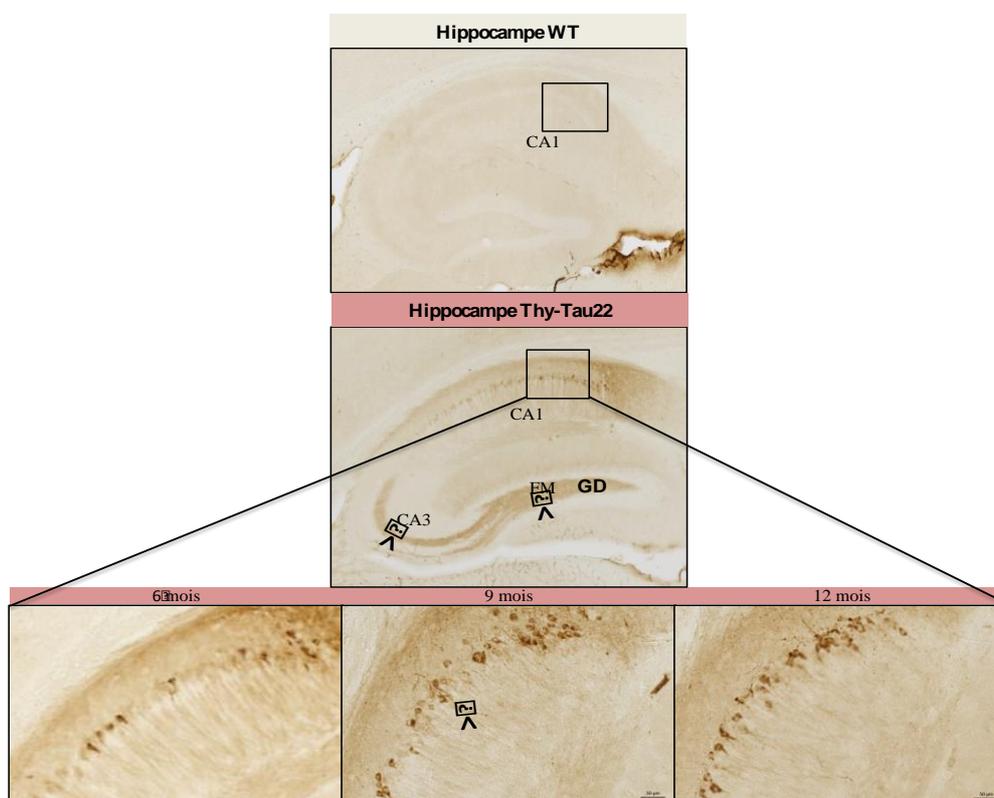


Figure 36 – Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de l'hippocampe provenant de souris WT et Thy-Tau22 par la technique d'immunohistochimie. Images représentatives de l'hippocampe de souris WT âgée de 12 mois et Thy-Tau22 âgées de 6, 9 et 12 mois après immunomarquage avec l'anticorps 2H2/D11. Aucun immunomarquage n'est observé chez la souris WT alors que chez la souris Thy-Tau22, l'immunomarquage est localisé dans la CA1, dans le compartiment somato-dendritique de neurones en DNF, et dans les régions CA3, GD et FM (barre d'échelle : 50 μ M). CA1 : Corne d'Ammon1, CA3 : Corne d'Ammon3, FM : fibres moussues, GD : gyrus denté.

Ce marquage dense est localisé au niveau du compartiment somato-dendritique de neurones en DNF et semble augmenter avec l'âge. De plus, un marquage diffus est observé (flèche, **Figure 36**) au niveau des fibres de la couche pyramidale de la CA1, de la CA3, de la couche granulaire du gyrus denté et dans les fibres moussues (axones des cellules granulaires du gyrus denté qui projettent vers les cellules pyramidales de la CA3). Afin de vérifier la spécificité de ce marquage, le test d'immunodéplétion sur peptides, ayant servi à montrer la spécificité de l'anticorps 2H2/D11 en WB, a été réalisé à nouveau. L'anticorps a été pré-incubé ou non avec les peptides avant de procéder à l'analyse par immunohistochimie de coupes flottantes de l'hippocampe de souris Thy-Tau22 âgées de 12 mois. Les résultats révèlent un marquage des neurones en DNF dans la CA1 lorsque l'anticorps n'est pas déplété ou pré-incubé avec le peptide Met11-Tau, ainsi que dans les régions CA3 et gyrus denté de l'hippocampe (**Figure 37**). En revanche, ce marquage est perdu lorsque l'anticorps est déplété avec le peptide AcMet11-Tau, ainsi les marquages observés chez la souris Thy-Tau22 sont bien spécifiques de la forme tronquée AcMet11-Tau.

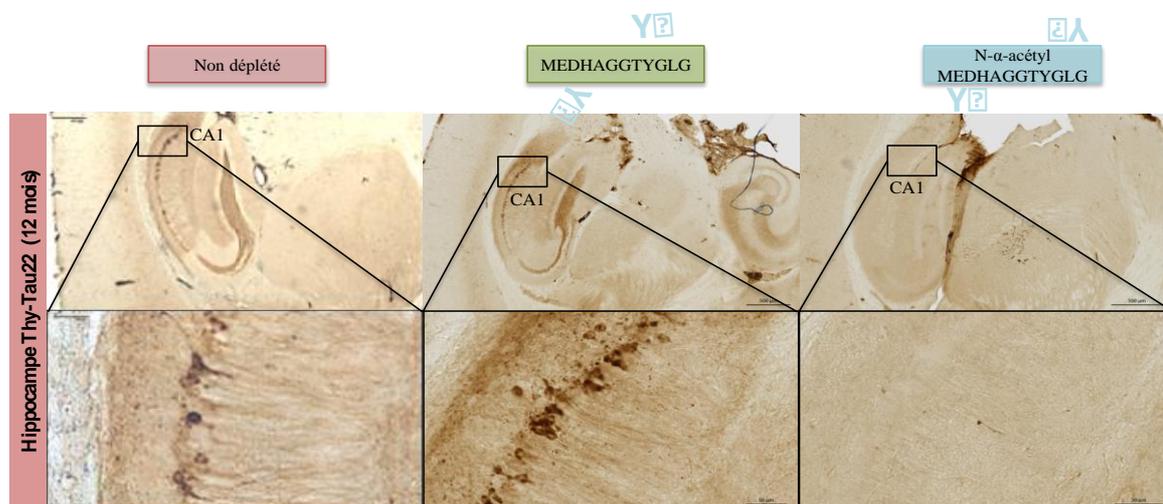


Figure 37 – Validation de l'immunomarquage obtenu chez la souris Thy-Tau22 avec l'anticorps 2H2/D11. Images représentatives de l'hippocampe de souris Thy-Tau22 âgées de 12 mois après immunodéplétion de l'anticorps 2H2/D11 avec les peptides Met11-Tau et AcMet11-Tau. (barre d'échelle : 50μM). CA1 : Corne d'Ammon1.

Par la suite, des immunohistochimies en fluorescence ont été réalisées dans le but de confirmer les résultats obtenus en visible et également d'observer si la forme tronquée AcMet11-Tau co-localise avec d'autres espèces de la protéine Tau. Cette technique a été réalisée sur des souris Thy-Tau22 âgées de 6, 9 et 12 mois. Pour cela, un double marquage avec l'anticorps 2H2/D11 et différents anticorps reconnaissant les domaines amino- (Tau-Nter) ou carboxy-terminaux (Tau-Cter), la Ser199 phosphorylée (P-Ser199) et la Ser422 phosphorylée (P-Ser422) a été réalisé ; les résultats présentés montrent les marquages représentatifs obtenus sur coupes de souris Thy-Tau22 de 9 mois.

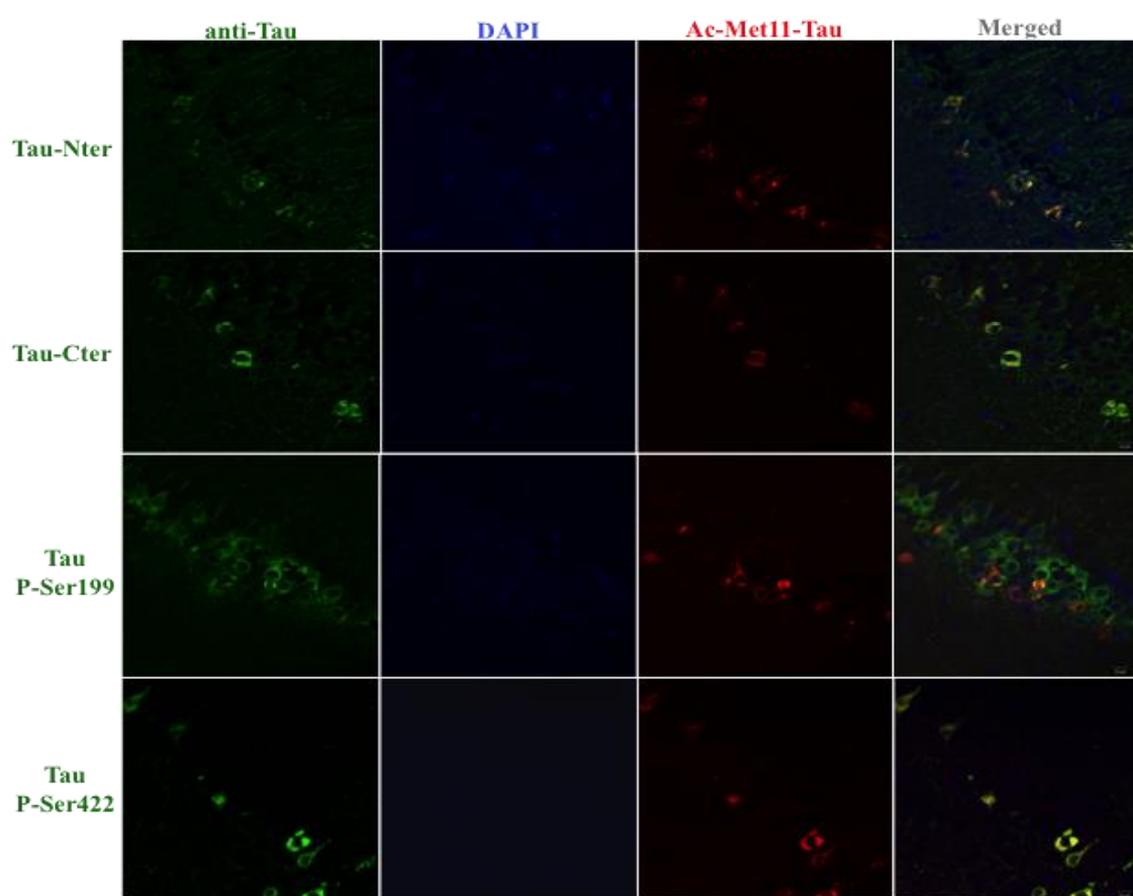


Figure 38 – La forme tronquée AcMet11-Tau co-localise avec une espèce de Tau pathologique dans les neurones en DNF dans la CA1 de souris Thy-Tau22. Images représentatives de l'analyse en microscopie confocale la CA1 de souris Thy-Tau22 âgées de 9 mois après co-marquage avec l'anticorps 2H2/D11 et les anticorps Tau-Nter, Tau-Cter, Tau P-Ser199 et Tau P-Ser422. (barre d'échelle : 10 μ M).

Ces résultats révèlent un marquage de quelques neurones en dégénérescence dans la CA1 pour la protéine Tau phosphorylée en Ser422 qui correspond à un site de phosphorylation pathologique (**Figure 38**). Ces mêmes neurones sont immunoréactifs pour la forme tronquée AcMet11-Tau. Ainsi, la forme tronquée AcMet11-Tau est retrouvée au sein des mêmes neurones que les espèces pathologiques de Tau. Pour les autres anticorps qui reconnaissent Tau indépendamment de son état d'agrégation, beaucoup de neurones présentent un marquage Tau-Cter, Tau-Nter et Tau P-Ser199 qui correspond à un site physiologique de phosphorylation, mais peu montrent un marquage pour la forme tronquée AcMet11-Tau. Ces résultats montrent donc que la forme tronquée AcMet11-Tau est localisée dans les neurones en DNF et co-localise avec des espèces de Tau pathologiques.

A.2.b. Par la méthode de dosage ELISA « sandwich »

A la vue des résultats obtenus par la méthode d'immunohistochimie sur le tissu cérébral murin provenant du modèle transgénique Thy-Tau22, il s'avérait intéressant d'utiliser une méthode permettant de détecter et quantifier la forme tronquée AcMet11-Tau et d'établir si cette forme est présente de manière précoce. Pour cela, un dosage ELISA de type « sandwich » a été mis au point avec l'anticorps 2H2/D11 en capture, en utilisant les extraits des lignées cellulaires stables et inductibles SH-SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R. Les résultats montrent que l'anticorps 2H2/D11 fonctionne dans cette application tout comme en WB et en immunohistochimie, de plus il détecte spécifiquement la forme tronquée AcMet11-Tau présente dans les cellules SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R (résultats non montrés). Suite à la mise au point de ce test, l'analyse d'une cinétique de souris WT et Thy-Tau22 âgées de 3, 7, et 12 mois a été réalisée. L'analyse des extraits protéiques d'hippocampe a montré que chez les souris Thy-Tau22, la forme tronquée AcMet11-Tau est détectée dans les différents échantillons de la cinétique tout comme pour le contrôle positif qui est la lignée SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R induite (**Figure 39**). De plus, il faut noter la détection de la forme tronquée AcMet11-Tau dès l'âge de 3 mois, âge où la pathologie n'a pas encore débutée ce qui suggère un rôle précoce dans la pathologie.

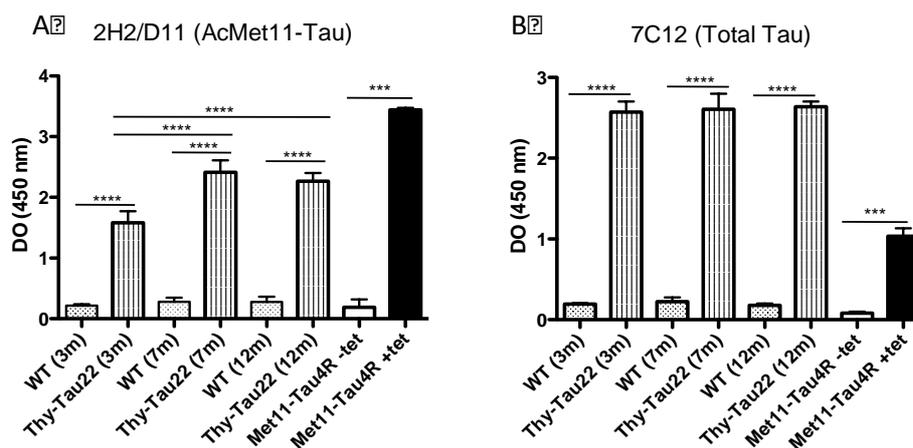


Figure 39 – La forme tronquée AcMet11-Tau est détectée précocement dans l’hippocampe de souris Thy-Tau22. Les histogrammes représentent les moyennes de densité optique (DO) obtenue par ELISA sandwich pour les extraits protéiques d’hippocampe de souris WT et Thy-Tau22 à 3, 7 et 12 mois (au nombre de 5 animaux par groupe). Les extraits des lignées cellulaires SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R non induite et induite sont utilisés comme contrôles négatif et positif, respectivement (n=3). (A) L’anticorps 2H2/D11 permet de mettre en évidence l’absence de la forme tronquée dans l’hippocampe des souris WT indépendamment de l’âge par rapport aux souris Thy-Tau22. Le contrôle positif étant la lignée cellulaire SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R induite (+tet). De plus, une augmentation de la forme tronquée AcMet11-Tau est observée entre 3 et 7 mois. (B) L’anticorps 7C12 (Tau totale) est utilisé comme contrôle de détection des niveaux de la protéine Tau au sein des échantillons. Les barres d’erreur indiquent l’erreur type (SD). (****) $p < 0.0001$ (***) $p < 0.005$. Les différences entre les valeurs moyennes ont été déterminées par une analyse *one way* ANOVA suivie d’un test *post hoc* LDS Fischer.

L’observation en immunohistochimie est confirmée par cette méthode, en effet entre 3 et 7 mois une augmentation de l’AcMet11-Tau est observée. A contrario, entre 7 et 12 mois, il n’y a pas d’augmentation observée, ce qui pourrait être expliqué par le fait que dans le modèle Thy-Tau22 la pathologie atteint un plateau à cet âge. Pour les souris WT qui n’expriment que la protéine Tau endogène murine, les densités optiques observées pour l’anticorps 2H2/D11 sont dans les mêmes niveaux que le contrôle négatif (SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R non induite). L’anticorps 7C12 (Tau totale) montre des différences de densité optique entre les WT et les Thy-Tau22 indépendamment de l’âge. Ce résultat s’explique par le fait que les souris Thy-Tau22 exprime la Tau endogène murine et le transgène humain. Par contre, les niveaux de la

protéine Tau totale est équivalent dans les différents échantillons de la cinétique Thy-Tau22.

L'analyse première du tissu cérébral provenant du modèle transgénique murin Thy-Tau22 a permis de mettre en évidence la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau dans ce modèle, notamment au niveau de régions cérébrales touchées par la pathologie (hippocampe, amygdale(non montré)). De plus, la forme tronquée AcMet11-Tau n'a pas été détectée dans les souris WT et ce indifféremment de l'âge. Ces résultats obtenus par immunohistochimie ont été validés par dosage ELISA, ce qui montre réellement la spécificité du marquage et de la présence de cette espèce de Tau dans un contexte pathologique. Ces résultats sont également appuyés par le fait d'observer la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de neurones immunoréactifs pour une espèce pathologique de Tau. De plus, les résultats ont montré que la forme tronquée AcMet11-Tau était présente avant le début de la pathologie, ce qui suppose un potentiel rôle dans le développement de la pathologie.

A.3. Analyse du tissu cérébral humain

A.3.a. Par la méthode d'immunohistochimie

A la suite des résultats très prometteurs obtenus chez la souris, des immunohistochimies en visible ont été réalisées sur le tissu cérébral humain provenant de patients Alzheimer et de sujets sains (NeuroBank, Lille). Pour cela, des coupes flottantes et en paraffine ont été utilisées, au total 10 sujets sains et 13 patients Alzheimer montrant des stades de Braak avancés ont été analysés. L'immunohistochimie a été réalisée avec les anticorps 2H2/D11 reconnaissant la forme tronquée AcMet11-Tau et AT8 reconnaissant un double site de phosphorylation Ser202/Thr205, ce dernier anticorps marque fortement les DNF à des stades modérés et sévères (Augustinack et al., 2002). De plus, l'anticorps AT8 est utilisé afin de

valider la pathologie au sein du tissu cérébral, notamment pour observer si les régions positives pour l'anticorps AT8 sont également positives pour l'anticorps 2H2/D11.

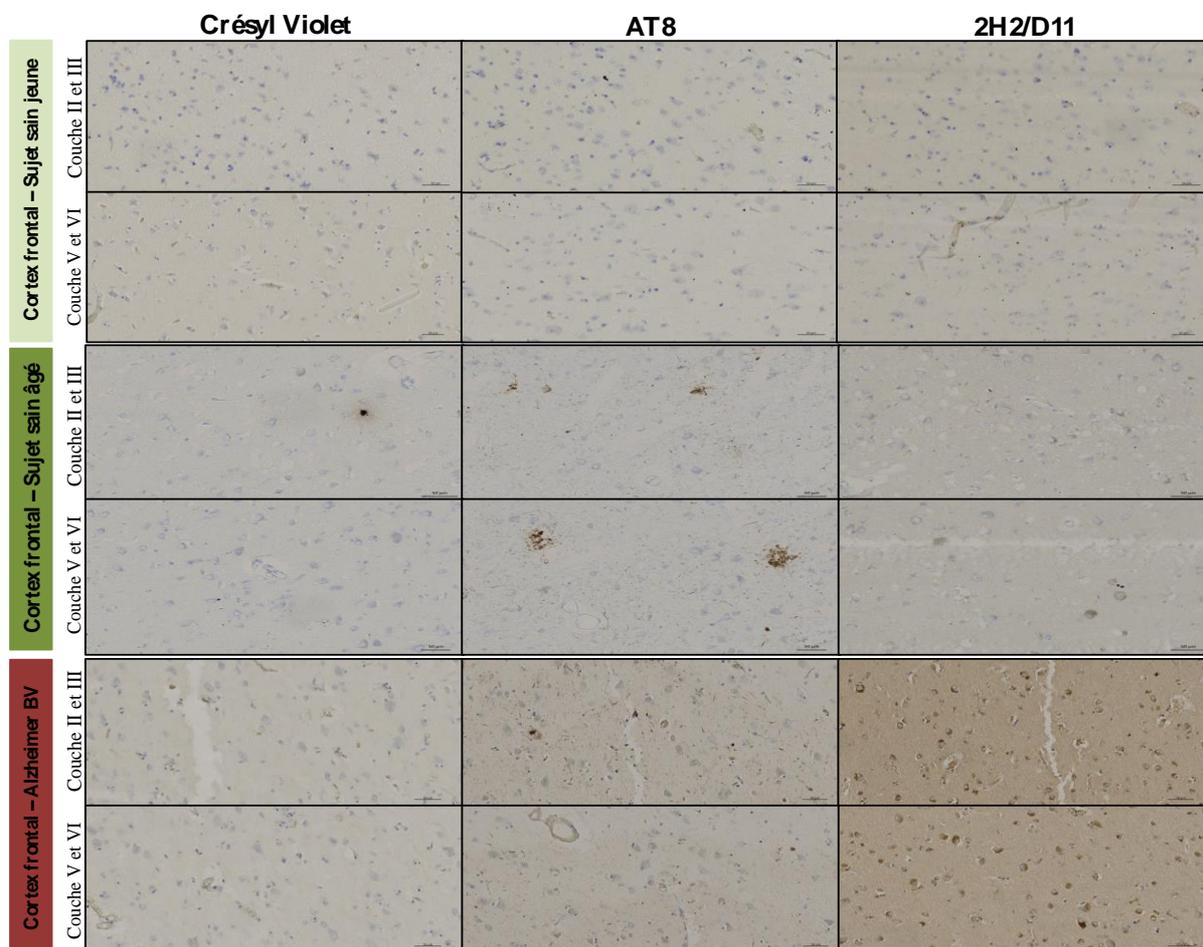


Figure 40 – Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein du cortex frontal de sujets sains et patients Alzheimers par la technique d'immunohistochimie. Images représentatives des couches II, III, V et VI de l'hippocampe provenant de deux sujets sains (jeune : patient n°54 et âgé : patient n°49) et d'un patient Alzheimer de stade Braak V (patient n°52) après immunomarquage avec les anticorps AT8 (P-Ser202/Thr205) et 2H2/D11. Aucun immunomarquage n'est détecté pour l'anticorps 2H2/D11 chez les sujets sains alors que la forme tronquée AcMet11-Tau est détectée chez le sujet Alzheimer, notamment sous un marquage somato-dendritique. Chez le sujet sain âgé, l'immunomarquage AT8 est positif ainsi que chez le patient Alzheimer, sous un marquage somato-dendritique et de plaque neuritique. (barre d'échelle : 50µM).

Ainsi, les résultats représentatifs de l'analyse du cortex frontal montrent une absence d'immunoréactivité chez le sujet sain jeune pour les deux anticorps. Concernant le sujet sain âgé, il montre un marquage de type « plaque neuritique » avec l'anticorps AT8 dans les couches II, III, V et VI du cortex ; de plus une immunoréactivité très faible est retrouvée en périphérie du noyau pour l'anticorps 2H2/D11 (Figure 40). Il faut noter que cette immunoréactivité positive pour la forme tronquée AcMet11-Tau n'est localisée que sur quelques neurones. En revanche l'analyse du patient Alzheimer de stade de Braak V montre un marquage des espèces de Tau positives pour l'anticorps AT8 dans les couches II et III mais une absence de marquage dans les couches V et VI. Pour le marquage 2H2/D11 celui-ci est présent dans les couches II, III, V et VI et au sein de nombreux neurones. Le type de marquage pour la forme tronquée AcMet11-Tau est périnucléaire et sous forme « d'accumulation de matériel » au niveau somato-dendritique.

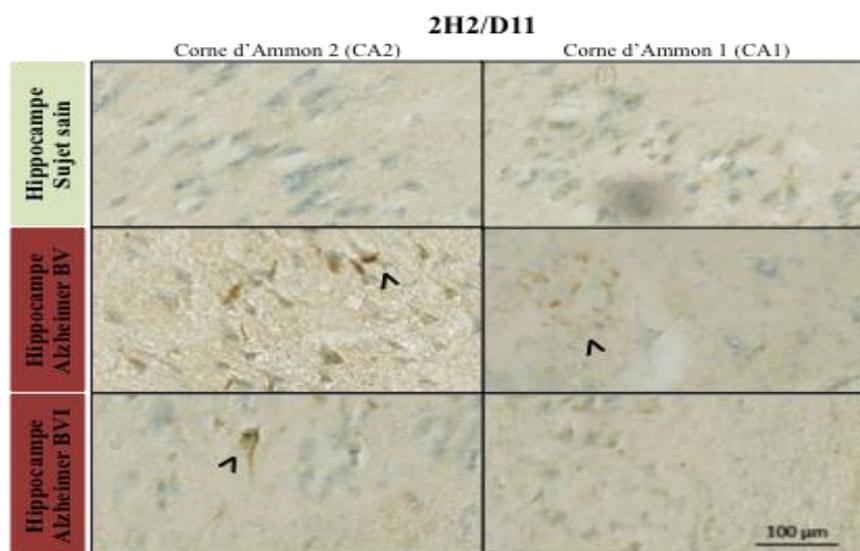


Figure 41 – Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de l'hippocampe de sujets sains et patients Alzheimers par la technique d'immunohistochimie. Images représentatives de la CA1 et CA2 provenant d'un sujet sain (patient n°39) et de deux patients Alzheimer de stade Braak V (patient n°41) et VI (patient n°42) après immunomarquage utilisant l'anticorps 2H2/D11. Aucun immunomarquage n'est détecté chez le sujet sain, alors que la forme tronquée AcMet11-Tau est détectée chez les patients Alzheimer, notamment sous un marquage de neurones en DNF, plaques neuritiques et neurites dystrophiques. (barre d'échelle : 100µM).

En addition du cortex frontal, la structure hippocampique a également été analysée par immunohistochimie visible en utilisant l'anticorps 2H2/D11. Les résultats représentatifs de l'analyse de l'hippocampe montrent une absence d'immunoréactivité pour la forme tronquée AcMet11-Tau chez le sujet sain aussi bien dans la CA1 et la CA2 (**Figure 41**). En revanche, les patients Alzheimer testés montrent une immunoréactivité positive pour l'anticorps 2H2/D11 que ce soit dans la CA1 ou la CA2. Les types de marquage sont variables : plaques neuritiques, neurones en DNF, neurites dystrophiques, marquage somato-dendritique dense et marquage dendritique.

Alors que la technique de WB n'avait pas permis de mettre en évidence la présence de la forme tronquée au sein du tissu cérébral humain, la technique d'immunohistochimie a révélé la présence de cette forme dans des neurones en DNF. En effet, l'analyse de 10 sujets sains et de 13 patients Alzheimer a permis de montrer que la forme tronquée AcMet11-Tau n'était pas retrouvée chez les sujets sains (hippocampe et cortex frontal) mais était détectée chez les sujets Alzheimer. Cependant, tous les patients Alzheimer analysés ne montrent pas un marquage positif pour la forme tronquée AcMet11-Tau. En effet, l'AcMet11-Tau a été observée dans l'hippocampe des 5 patients Alzheimer analysés mais elle n'a été observée que dans le cortex frontal de 10 patients Alzheimer sur les 13 patients analysés. De plus, il n'y a pas de corrélation apparente entre le marquage AT8 et le marquage 2H2/D11 au sein du cortex frontal. Ainsi, ces résultats montrent que la forme tronquée AcMet11-Tau est localisée dans les neurones en DNF au sein du tissu cérébral provenant de patients Alzheimer.

A.3.b. Par la méthode de dosage ELISA « sandwich »

Du fait des résultats obtenus par la méthode d'immunohistochimie sur le tissu cérébral humain, les extraits protéiques de cortex temporal provenant de 9 patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de 7 sujets sains qui ont servis pour l'analyse par la méthode de WB (**Tableau 4**) ont été à nouveau étudiés. En effet, par la technique de WB, aucune immunoréactivité pour l'anticorps n'avait été observée. En revanche par

la méthode de dosage ELISA sandwich, les résultats montrent que l'anticorps 7C12 (Tau totale) réagit de manière identique pour les échantillons Alzheimers et sains, alors que pour l'anticorps 2H2/D11, il réagit spécifiquement et uniquement avec les échantillons Alzheimers (**Figure 42**). Ainsi, ces résultats révèlent que la forme tronquée AcMet11-Tau est détectée au sein du cortex temporal de patients Alzheimer.

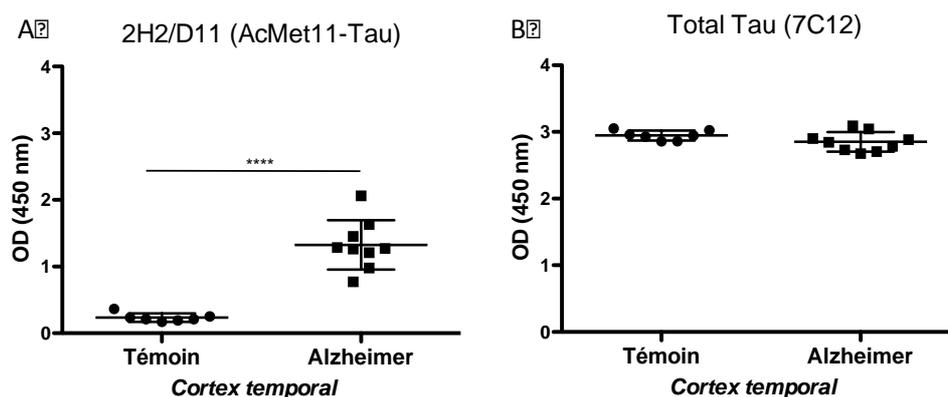


Figure 42 – La forme tronquée AcMet11-Tau est détectée par ELISA sandwich dans le cortex temporal de patients Alzheimer. Les résultats en nuage de points représentent les densités optiques (DO) obtenues pour les extraits protéiques de cortex temporal provenant de 7 sujets sains et 9 patients Alzheimer (n=3). (A) L'anticorps 2H2/D11 met en évidence l'absence de détection de la forme tronquée AcMet11-Tau chez les sujets sains alors que les patients Alzheimers montrent de manière significative une bonne détection de la forme tronquée AcMet11-Tau. (B) L'anticorps 7C12 (Tau totale) est utilisé comme contrôle de détection de la protéine Tau au sein des échantillons. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type (SD). (****) $p < 0.0001$. Les différences entre les valeurs moyennes ont été déterminées par une analyse *Mann-Whitney*.

Suite à ces résultats, les extraits protéiques de cortex frontal de ces mêmes patients ont été analysés. Les résultats ont montré une différence significative entre les sujets sains et les patients Alzheimer pour la forme tronquée AcMet11-Tau alors que pour la protéine Tau entière il n'y a pas de différence observée (**Figure 44**). De plus, il faut noter une hétérogénéité dans la distribution du cortex frontal des patients Alzheimers comparé au cortex temporal pour la forme tronquée AcMet11-Tau. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que le cortex frontal est plutôt l'une des dernières zones touchées par la pathologie Tau. De plus, la caractérisation de ces

patients par WB en utilisant l'anticorps Tau P-Ser396 montre des profils électrophorétiques différents, en effet certains patients montrent une plus faible immunoréactivité pour les formes agrégées de Tau (patients n°9 et n°11 qui correspondent à des stades de Braak III et IV respectivement). D'ailleurs, par la technique d'immunohistochimie les différents cortex frontaux des patients Alzheimer ne s'étaient pas révélés positifs pour la forme tronquée AcMet11-Tau. L'analyse de l'hippocampe de ces patients est actuellement en cours, mais il serait intéressant d'observer si elle est détectée dans des stades plus précoces de la maladie d'Alzheimer (stade de Braak I à II). En effet, les patients Alzheimers utilisés présentent des stades d'avancée de la pathologie sévères (stade de Braak IV à VI) et modérés (stade de Braak III à IV), or lors de l'analyse chez le modèle murin transgénique Thy-Tau22, il a été montré une présence de la forme tronquée AcMet11-Tau dès l'âge de 3 mois, âge où la pathologie Tau est à ses débuts.

L'analyse du tissu cérébral humain provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a permis de mettre en évidence la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de différentes régions cérébrales (cortex frontal, cortex temporal et hippocampe). De plus, cette espèce de Tau n'a pas été détectée chez les sujets sains, ce qui montre une réelle association de la forme tronquée AcMet11-Tau avec la pathologie Tau, notamment au sein de la maladie d'Alzheimer. Le marquage immunohistochimie à l'aide de l'anticorps 2H2/D11 a permis de révéler de nombreux marquages pathologiques tels que des plaques neuritiques, des neurones en DNF, etc.

B. Association de la forme tronquée AcMet11-Tau avec d'autres Tauopathies ?

La troncation de la protéine Tau n'est pas exclusivement restreinte à la maladie d'Alzheimer, en effet, des études ont montré la présence de formes tronquées de Tau dans d'autres Tauopathies telles que la PSP, la DCB et la maladie de Pick (Hanger and Wray, 2010). Dans ce contexte et à la vue des résultats obtenus sur le tissu cérébral de

patients Alzheimer, des études sur le tissu cérébral de patients atteints d'autres Tauopathies ont été initiées.

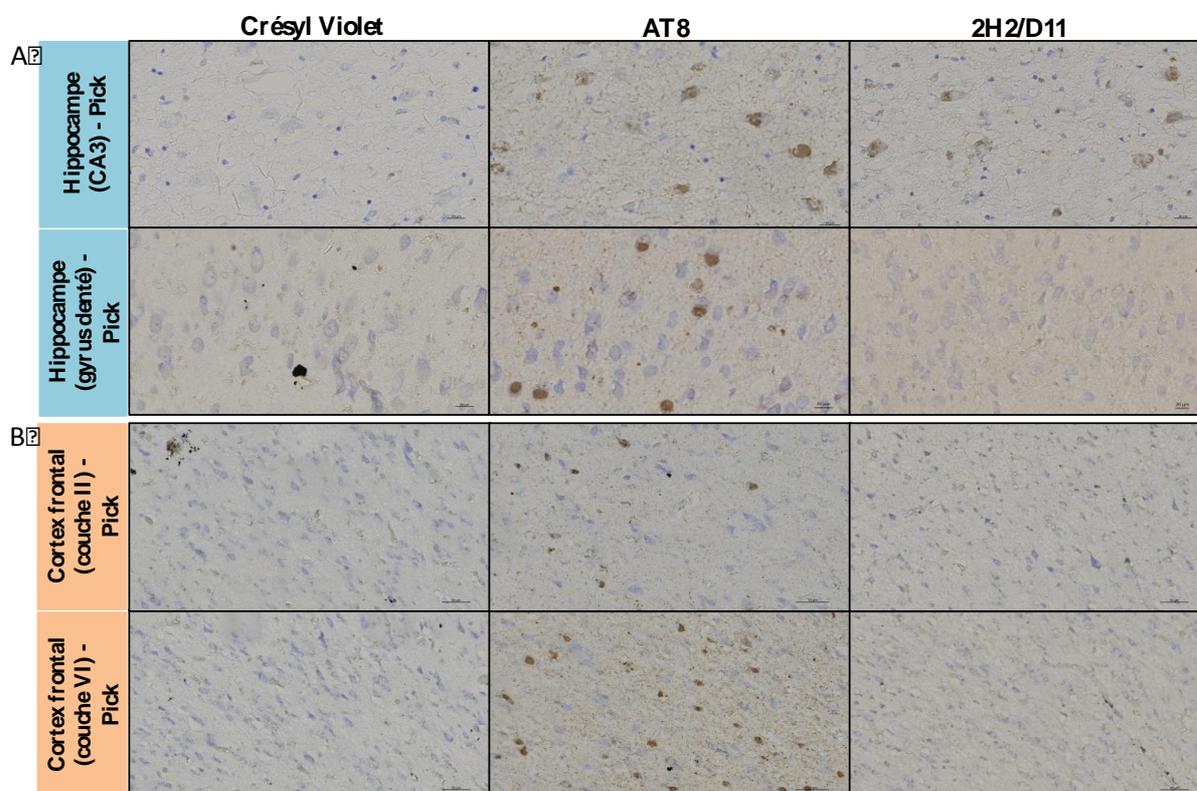


Figure 43 – Analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de l'hippocampe et du cortex frontal de patients atteints de la maladie de Pick par la technique d'immunohistochimie. (A) Images représentatives de la CA3 et du gyrus denté provenant d'un sujet Pick (patient n°19) après immunomarquage utilisant les anticorps AT8 (P-Ser202/Thr205) et 2H2/D11. L'anticorps AT8 marque les corps de Pick au niveau de la CA3 et du gyrus denté. Pour l'anticorps 2H2/D11, l'immunomarquage n'est retrouvé que dans la CA3. (B) Images représentatives du cortex frontal provenant d'un sujet Pick (patient n°19) après immunomarquage utilisant les anticorps AT8 (P-Ser202/Thr205) et 2H2/D11. L'anticorps AT8 marque les corps de Pick au niveau des couches II et VI. Pour l'anticorps 2H2/D11, aucun immunomarquage n'est détecté. (barre d'échelle : 20µM).

Une immunohistochimie en visible utilisant les anticorps 2H2/D11 et AT8 a été réalisée sur l'hippocampe, le cortex frontal et le cortex temporal de deux patients atteints de la maladie de Pick et de neuf patients DFTP-17. Les résultats représentatifs de l'analyse des patients Pick montrent une immunoréactivité positive pour l'anticorps AT8 sous un faible marquage des corps de Pick dans l'hippocampe (CA3 et gyrus denté) et dans les couches II et VI du cortex frontal. Sur les deux patients Pick

analysés, un seul présente une immunoréactivité positive pour l'anticorps 2H2/D11 au sein de l'hippocampe (région CA3 uniquement) mais aucune immunoréactivité au sein du cortex frontal (**Figure 43**). Ainsi, les régions cérébrales positives pour l'anticorps AT8 ne s'avèrent pas toutes positives pour l'anticorps 2H2/D11. Concernant les neuf patients DFTP-17, un seul patient montrait un faible marquage pour la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de l'hippocampe, et aucun marquage dans le cortex frontal et temporal (résultats non montrés). Ainsi, l'analyse par immunohistochimie ne permettait pas de conclure quant à la présence ou l'absence de la forme tronquée AcMet11-Tau dans d'autres Tauopathies. En effet, le nombre d'échantillons disponibles était très limité et les régions cérébrales affectées par la pathologie n'étaient pas disponibles pour chaque patient. De ce fait, l'analyse de la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau dans d'autres Tauopathies a été réalisée par une méthode biochimique car un plus grand nombre de tissus cérébraux humains était disponible pour cette application.

Dans le but de confirmer ces observations, des dosages ELISA ont été réalisés sur le cortex frontal de patients atteints de la maladie de Pick, de patients possédant des mutations du gène MAPT (DFTP-17) et de patients PSP. L'inclusion de patients PSP permettant de se placer dans un contexte de Tauopathie où seuls les isoformes 4R de Tau s'agrègent en comparaison avec la maladie de Pick (pour revue, Williams, 2006). Ces patients ont d'abord été caractérisés par WB en utilisant l'anticorps Tau P-Ser396 qui a montré une hétérogénéité entre les profils électrophorétiques des protéines Tau phosphorylées (**Figure 44**). En effet, pour les patients Pick et MAPT, les résultats montrent une forte immunoréactivité pour l'anticorps Tau P-Ser396 avec notamment un fort marquage des formes agrégées. Pour les patients PSP, et comme attendu, l'immunoréactivité des formes agrégées est très faible. En effet, chez ces patients, la pathologie Tau touche principalement la région du mésencéphale. Par la méthode de dosage ELISA, les résultats utilisant l'anticorps 2H2/D11 montrent que la forme tronquée AcMet11-Tau est faiblement détectée dans le cortex de patients atteints de la maladie de Pick et de DFTP-17 (**Figure 44**).

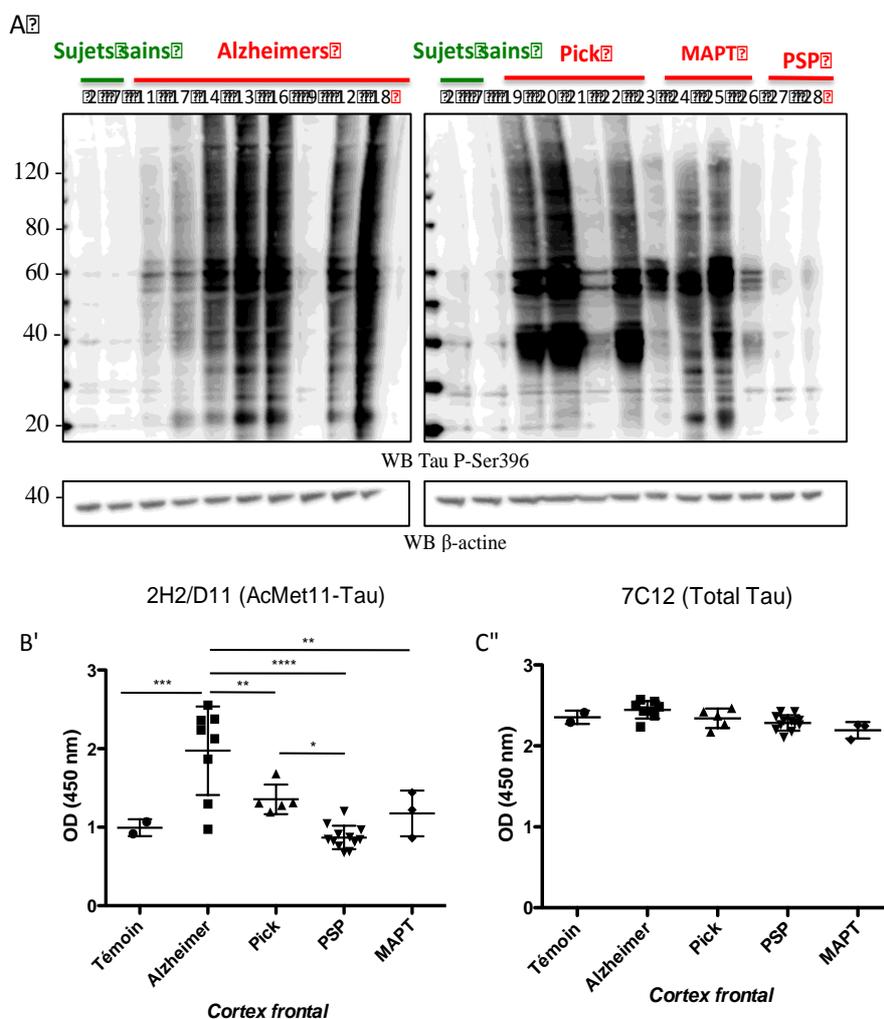


Figure 44 – La forme tronquée AcMet11-Tau est principalement détectée dans le cortex frontal de patients Alzheimers. (A) Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de l'expression des protéines Tau au sein du cortex frontal provenant de 2 sujets sains (2 et 7), 8 patients Alzheimer (11, 17, 14, 13, 16, 9, 12 et 18), 5 patients Pick (19, 20, 21, 22 et 23), 3 patients DFTP-17/MAPT (24, 25 et 26) et 2 patients PSP (27 et 28). L'anticorps Tau P-Ser396 met en évidence les Tau pathologiques : les formes agrégées et hyperphosphorylées. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés et l'immunoréactivité de la β -actine est utilisée comme contrôle de charge. (B) et (C) Les résultats en nuage de points représentent les densités optiques (DO) obtenues pour les analyses par ELISA sandwich des extraits protéiques de cortex frontal provenant de 2 sujets sains, 8 patients Alzheimer, 5 patients Pick, 12 patients PSP et 3 patients MAPT (n=3). (B) L'anticorps 2H2/D11 met en évidence une détection de la forme tronquée AcMet11-Tau chez patients Alzheimers, significativement plus élevée que les sujets sains, PSP et MAPT. (C) L'anticorps 7C12 (Tau totale) est utilisé comme contrôle de détection de la protéine Tau au sein des échantillons. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type (SD). (****) $p < 0.0001$. (***) $p = 0.0010$. (**) $p = 0.0016$. (*) $p = 0.0112$. Les différences entre les valeurs moyennes ont été déterminées par une analyse *one way* ANOVA suivie d'un test *post hoc* LDS Fischer.

En revanche, elle n'est pas détectée dans le cortex frontal de patients atteints de PSP, en effet, dans cette Tauopathie cette zone cérébrale est touchée par la pathologie Tau dans des stades tardifs (Williams et al., 2007). L'utilisation de l'anticorps 7C12 (Tau totale) montre que l'absence de détection de la forme tronquée AcMet11-Tau n'est pas due à l'absence de la protéine Tau au sein des différents patients.

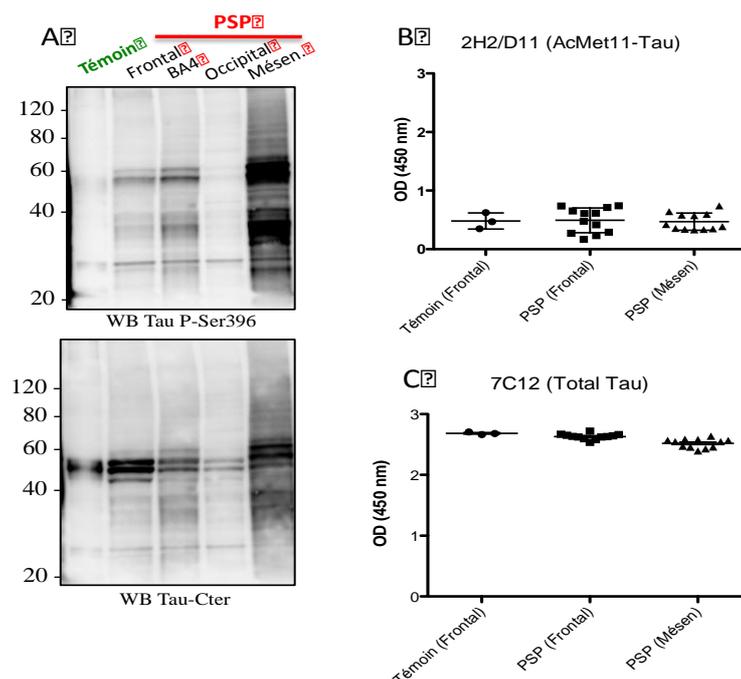


Figure 45 – La forme tronquée AcMet11-Tau n'est pas détectée dans le mésencéphale de patients PSP. (A) Figure représentative de l'analyse par immunopempreinte de l'expression des protéines Tau au sein d'un sujet sain et d'un patient PSP (36) (cortex frontal, aire BA4 : aire motrice primaire, cortex occipital, Mésén : mésencéphale). L'anticorps Tau P-Ser396 et Tau-Cter mettent en évidence les isoformes de Tau, les formes agrégées et tronquées. Le mésencéphale étant la région la plus touchée par la pathologie dans la PSP. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés. (B) et (C) Les résultats en nuage de points représentent les densités optiques (DO) obtenue pour les analyses par ELISA sandwich des extraits protéiques de cortex frontal provenant de 3 sujets sains et 12 patients PSP pour le cortex frontal et le mésencéphale (n=3). (B) L'anticorps 2H2/D11 met en évidence une détection nulle de la forme tronquée AcMet11-Tau chez les sujets sains et PSP, aussi bien dans le cortex frontal que dans le mésencéphale. (C) L'anticorps 7C12 (Tau totale) est utilisé comme contrôle de détection de la protéine Tau au sein des échantillons. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type (SD). Les différences entre les valeurs moyennes ont été déterminées par une analyse *one way* ANOVA suivie d'un test *post hoc* LDS Fischer.

Ainsi, pour les patients PSP, des analyses ELISA de la forme tronquée AcMet11-Tau ont été réalisées sur le mésencéphale. Les résultats utilisant l'anticorps 2H2/D11 ont montré qu'elle n'est pas non plus détectée dans cette région qui est l'une des principales régions affectées dans cette Tauopathie (**Figure 45**). Comme précédemment, l'utilisation de l'anticorps 7C12 (Tau totale) montre que l'absence de détection de la forme tronquée AcMet11-Tau n'est pas due à l'absence de la protéine Tau au sein de cette région cérébrale. De plus, l'analyse par WB en utilisant l'anticorps Tau P-Ser396 a montré que parmi différentes régions cérébrales testées, les formes agrégées sont fortement marquées dans le mésencéphale en comparaison avec le cortex frontal et l'aire motrice primaire (BA4).

Les études d'association de la forme tronquée AcMet11-Tau avec la pathologie Tau ont montré la présence de cette espèce de Tau au sein du tissu cérébral du modèle murin transgénique Thy-Tau22 et de manière significative dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Dans un premier temps, les études sur le tissu cérébral murin ont montré que l'AcMet11-Tau est détectée dès l'âge de 3 mois dans ce modèle, âge auquel la pathologie Tau n'a pas débutée ; elle est également détectée à des âges plus avancés. En addition, l'AcMet11-Tau est localisée au sein des neurones immunoréactifs pour la forme phosphorylée de Tau en Ser422, une espèce de Tau pathologique. Dans un second temps, l'analyse du tissu cérébral humain a également permis de montrer la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau dans l'hippocampe, le cortex temporal et le cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Alors qu'aucune observation n'a été montrée dans le tissu cérébral provenant des sujets sains. La protéine Tau étant le dénominateur commun des Tauopathies, des études d'association ont été entreprises dans le tissu cérébral provenant de patients atteints de la maladie de Pick, des DFTP-17 et de la PSP. Les résultats montrent que, la forme tronquée AcMet11-Tau est principalement associée à la maladie d'Alzheimer. D'autres études complémentaires sont encore nécessaires afin d'explorer si la forme tronquée AcMet11-Tau peut être appariée à des stades de la pathologie Tau.

Chapitre 3 : Vers la caractérisation fonctionnelle de la forme tronquée Met11-Tau et la détermination du rôle de la N- α -acétylation

Après l'identification des nouveaux sites de troncation sur la protéine Tau, des études fonctionnelles ont été menées, dans le cadre de la thèse du Dr. Derisbourg Maxime, afin de déterminer l'impact de la délétion de l'extrémité amino-terminale sur la fonction principale de Tau, la régulation de la dynamique microtubulaire (Derisbourg et al., 2015, en annexe). Les sites de troncation choisis sont les résidus Met11 et Gln124 localisés dans la partie amino-terminale de Tau. Ces études ont été réalisées dans la lignée cellulaire de neuroblastome murin (N1E-115) transitoirement transfectée avec les différentes formes tronquées. Les résultats de ces études ont montré un gain de fonction pour la forme tronquée débutant par le résidu Gln124 (Gln124-Tau) par rapport à la protéine Tau entière. En effet, cette forme tronquée est retrouvée plus fortement liée aux microtubules et plus protectrice vis-à-vis de leur dépolymérisation. En revanche, les études fonctionnelles de la forme tronquée débutant par la Met11 (Met11-Tau) n'ont pas montré de différence de comportement, par rapport à la protéine Tau entière, vis à vis de la régulation de la dynamique des microtubules. Mais notre interprétation de ce résultat a été remise en question lorsque nous avons découvert par la suite que la forme Met11-Tau est également retrouvée dans ces cellules sous forme N- α -acétylée ; le rôle de cette modification sur Tau n'étant pas connu aujourd'hui.

Ce troisième chapitre des résultats se focalisera sur le début d'étude du rôle de la N- α -acétylation et la caractérisation fonctionnelle de la forme tronquée AcMet11-Tau. Dans une première partie sera exposé le développement d'outils appropriés à la modulation du niveau de la N- α -acétylation de la forme tronquée Met11-Tau, notamment par des approches de surexpression et d'inhibition de la potentielle N- α -acétyltransférase (Nat) impliquée. Dans une seconde partie, le début des études fonctionnelles de la forme tronquée AcMet11-Tau sera exposé, notamment sur le rôle de stabilité protéique puisque la N- α -acétylation est impliquée, entre autres, dans cette fonction.

A. Modèle d'étude cellulaire et validation de la forme tronquée AcMet11-Tau

Afin de réaliser les études fonctionnelles de la forme tronquée AcMet11-Tau, des lignées cellulaires stables et inductibles SH-SY5Y/TR exprimant les protéines Tau1N4R, Tau1N3R, Met11-Tau4R et Met11-Tau3R ont été générées. L'analyse de l'expression des transgènes a été montrée dans le premier chapitre des résultats. Du fait que l'anticorps 2H2/D11 n'était pas encore généré lors de l'obtention des lignées cellulaires ; la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de la lignée SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R avait été vérifiée par la technique de spectrométrie de masse. Dès l'obtention de l'anticorps 2H2/D11, celui-ci a été utilisé pour analyser les extraits protéiques des différentes lignées par WB.

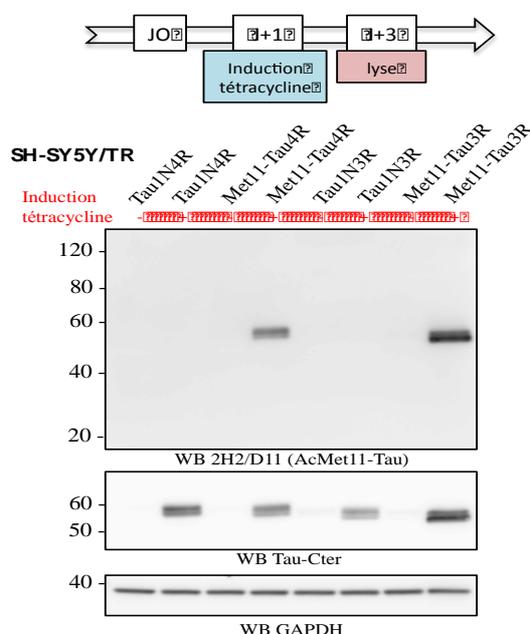


Figure 46 – Profil d'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau4R et AcMet11-Tau3R. Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de l'expression des transgènes après 48h d'induction avec la tétracycline dans les lignées cellulaires SH-SY5Y stables et inductibles. L'immunoempreinte utilisant l'anticorps 2H2/D11 montre l'expression des formes tronquées AcMet11-Tau4R et AcMet11-Tau3R au sein des lignées cellulaires SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R et Met11-Tau3R. L'immuno-empreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter montre l'expression des protéines Tau1N4R et Tau1N3R ainsi que les formes tronquées Met11-Tau4R et Met11-Tau3R. Cette expression n'est présente que dans les cellules traitées à la tétracycline. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés et l'immunoréactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

Après 48 heures d'induction de l'expression des transgènes, les résultats par immuno-empreinte utilisant l'anticorps 2H2/D11 confirment la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau dans les lignées SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R et Met11-Tau3R (Figure 46). Cette immunoréactivité n'est présente que dans ces lignées aux masses moléculaires attendues d'environ 56kDa et 52kDa, respectivement. Ainsi, ces résultats valident la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau dans ces lignées cellulaires stables en prolifération.

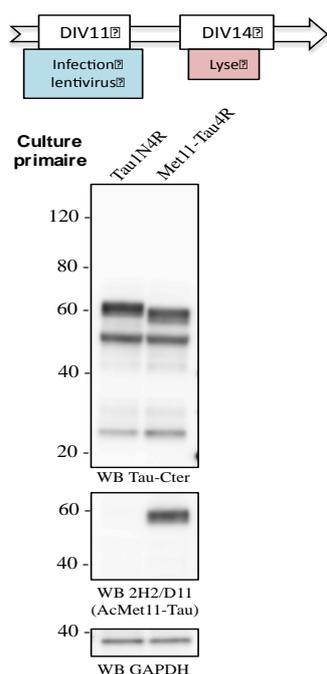


Figure 47 – La N- α -acétylation peut avoir lieu dans un contexte de cellule différenciée. Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de l'expression des protéines Tau1N4R et Met11-Tau4R après 72h d'infection dans les cultures primaires de cortex de rat. L'immuno-empreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter montre l'expression de la protéine Tau1N4R ainsi que de la forme tronquée Met11-Tau4R. L'immunoempreinte utilisant l'anticorps 2H2/D11 montre l'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau dans les cultures infectées avec le lentivirus Met11-Tau4R. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés et l'immunoréactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

Par la suite, et en vue de valider les études fonctionnelles dans un modèle cellulaire différenciée, des infections de vecteurs lentiviraux contenant la séquence codante de Tau1N4R et Met11-Tau4R ont été réalisées dans des cultures primaires de cortex de rat à 11 divisions cellulaires (DIV11). Après 72 heures d'infection, les extraits protéiques ont été analysés par WB. Les résultats par immuno-empreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter révèlent l'expression des transgènes aux poids moléculaires attendus d'environ 58kDa pour la Tau1N4R et 56kDa pour l'espèce Met11-Tau4R (Figure 47). En addition des vecteurs lentiviraux, l'anticorps Tau-Cter révèle également l'expression endogène de Tau présente au sein des cultures primaires. L'immuno-empreinte utilisant l'anticorps 2H2/D11 montre qu'au sein des

cultures primaires infectées avec le lentivirus Met11-Tau4R, cette forme tronquée est également retrouvée N- α -acétylée. Ainsi, ces résultats montrent que la N- α -acétylation peut également avoir lieu dans un contexte de cellule post-mitotique tel que le neurone.

B. Vers l'identification de la Nat responsable de la N- α -acétylation de la forme tronquée AcMet11-Tau

Afin de pouvoir réaliser les études fonctionnelles de la forme tronquée AcMet11-Tau, il fallait utiliser des approches ayant pour but de moduler le niveau de N- α -acétylation. Pour cela, les lignées stables et inductibles générées ont été utilisées afin de déterminer la Nat responsable de cette modification sur la forme tronquée Met11-Tau. Dans un premier temps, la vérification de la présence des différentes Nats au sein de la lignée cellulaire de neuroblastome humain a été vérifiée par RT-qPCR. Les résultats ont montré que toutes les sous-unités catalytiques et régulatrices sont exprimées au sein de cette lignée (résultats non montrés). Dans un second temps, afin d'identifier l'enzyme responsable, deux approches ont été utilisées : 1) une approche de surexpression et 2) une approche d'inhibition, en focalisant sur la NatB. En effet, d'après la spécificité de substrats reportée dans la littérature pour les différentes Nats, La NatB N- α -acétyle la Méthionine (M) en position amino-terminale d'une protéine lorsqu'elle est suivie d'un Glutamate (E), Aspartate (D), Asparagine (N) ou Glutamine (Q). En observant le début de la séquence de la forme tronquée AcMet11-Tau (<N- α -acétyl> MEDHAGTYG...), le résidu suivant la Méthionine est un Glutamate. Ainsi, l'hypothèse émise est que la NatB serait responsable de la N- α -acétylation de la forme tronquée Ac-Met11-Tau.

B.1. Surexpression de la NatB dans les lignées stables et inductibles

Afin de répondre à l'hypothèse émise sur la potentielle Nat responsable, une approche de surexpression de la sous-unité catalytique de la NatB (sous-unité Naa20)

a été réalisée par transfection transitoire durant 48 heures dans les lignées stables et inductibles SH-SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R.

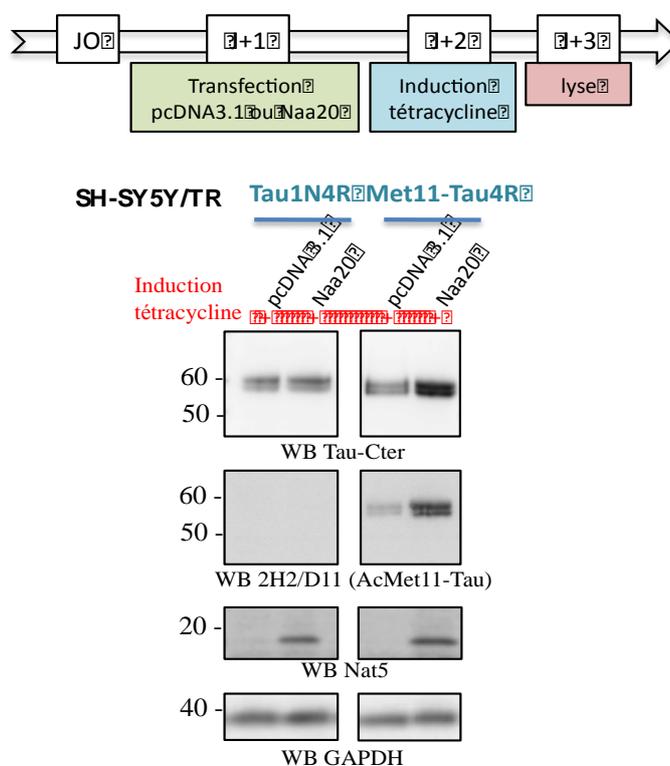


Figure 48 – Effet de la surexpression de la sous-unité catalytique de la NatB (Naa20). Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de la surexpression de la Naa20 après transfection et induction à la tétracycline dans les lignées cellulaires stables et inductibles. L'immuno-empreinte utilisant l'anticorps Nat5 montre la surexpression de la Naa20 par rapport au vecteur vide pcDNA3.1. L'immunoempreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter montre l'expression des protéines Tau1N4R et Met11-Tau4R après induction. Et l'immuno-empreinte utilisant l'anticorps 2H2/D11 montre une augmentation d'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau lors de la surexpression de la Naa20 par rapport au vecteur vide pcDNA3.1. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés (contre quinze microgrammes pour l'anticorps Nat5) et l'immunoréactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

Les résultats obtenus par immunoempreinte utilisant l'anticorps Nat5 révèlent une bonne surexpression de la sous-unité Naa20 par rapport aux cellules transfectées avec le vecteur vide pcDNA3.1 qui présentent une faible expression endogène. Afin d'observer un effet sur les transgènes exprimés dans les lignées stables et inductibles, les cellules ont été induites post-transfection pendant 24 heures (Figure 48). La

vérification de l'efficacité d'induction est réalisée grâce à l'immunoempreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter, les résultats montrent l'expression de la Tau1N4R et de la Met11-Tau4R aux poids moléculaires attendus. De plus, l'utilisation de l'anticorps 2H2/D11 dirigé contre la forme tronquée AcMet11-Tau révèle une augmentation de l'expression de l'AcMet11-Tau lorsque la sous-unité Naa20 est surexprimée par rapport au vecteur vide pcDNA3.1 dans la lignée Met11-Tau4R. Ainsi, ces résultats montrent que la NatB peut être responsable de la N- α -acétylation de la forme tronquée Met11-Tau. Il faut également remarquer l'augmentation du niveau d'immunoréactivité avec l'anticorps Tau-Cter avec les extraits des cellules Met11-Tau4R lorsque la sous-unité Naa20 est surexprimée, mais pas dans les cellules Tau1N4R. Ce résultat qui sera discuté dans la suite des résultats concernant les conséquences de la N- α -acétylation sur la protéine Tau, suggère que l'augmentation de la N- α -acétylation de Met11-Tau s'accompagne d'une augmentation de sa stabilité protéique. Malheureusement, l'effet de la surexpression de la sous-unité catalytique de NatB sur la N- α -acétylation de Met11-Tau n'a pas montré de reproductibilité lors des différentes expériences indépendantes ; de ce fait plusieurs hypothèses sont émises : 1) l'efficacité de transfection de la lignée SH-SY5Y est très faible ; 2) la NatB doit être surexprimée avant l'induction du transgène étant donné que la N- α -acétylation est une modification co-traductionnelle et 3) le niveau de N- α -acétylation de base est peut-être au plateau maximum. Ainsi, à la vue de ces résultats une autre approche de modulation de la N- α -acétylation a été entreprise.

B.2. Inhibition de la NatB dans les lignées stables et inductibles

Dans le but de valider que la NatB est bien responsable de la N- α -acétylation plusieurs approches d'inhibition de l'expression de la sous-unité catalytique Naa20 avaient été entreprises. Dans un premier temps, la technique de CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Nuclease Cas9*) a été utilisée dans la lignée cellulaire SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R pour invalider le gène codant la sous-unité Naa20. Malheureusement, cette technique n'a pas permis d'obtenir une lignée cellulaire délétée pour le gène codant la sous-unité Naa20 ; en

effet une très forte toxicité cellulaire a été observée. Il faut noter que les Nats sont impliquées dans le cycle cellulaire, notamment la NatB qui joue un rôle important dans la progression de celui-ci et l'inhibition de son expression entraîne une inhibition de la croissance cellulaire et arrêt du cycle cellulaire (Starheim et al., 2008).

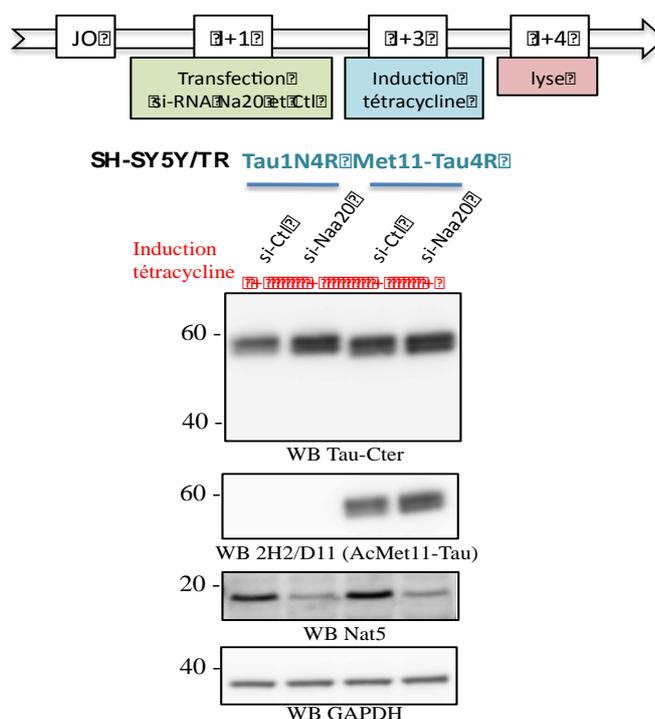


Figure 49 – Réduction du taux de la sous-unité catalytique de la NatB (Naa20) par la méthode de si-RNA. Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de la baisse du taux de la Naa20 après transfection de si-RNA et induction à la tétracycline dans les lignées cellulaires stables et inductibles. L'immuno-empreinte utilisant l'anticorps Nat5 montre la baisse de la Naa20 lors de l'utilisation du si-Naa20 par rapport au si-Ctl. L'immunoempreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter montre l'expression des protéines Tau1N4R et Met11-Tau4R après induction. Et l'immuno-empreinte utilisant l'anticorps 2H2/D11 ne montre pas de diminution d'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau lors de la baisse par siRNA de la Naa20 par rapport au si-Ctl. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés (contre quinze microgrammes pour l'anticorps Nat5) et l'immunoréactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

Dans un second temps, une approche par si-RNA (*small interfering RNA*) a été utilisée, pour cela un pool de quatre si-RNA dirigés contre l'ARNm de la sous-unité Naa20 a été transfecté pendant 72 heures dans les lignées cellulaires SH-SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R. Après plusieurs mises au point, l'analyse par WB a

montré une diminution de l'expression de la sous-unité Naa20 au sein des deux lignées 72h après transfections (**Figure 49**). Afin d'observer si cette baisse du niveau de la sous-unité Naa20 entraîne un effet sur le niveau d'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau, l'immuno-empreinte utilisant l'anticorps 2H2/D11 a été utilisée. Après 24 heures d'induction dans les cellules transfectées, les résultats ne montrent pas de diminution de l'expression de l'AcMet11-Tau en présence du si-Naa20 comme attendu normalement.

A la vue de ces résultats, une technique utilisant des lentivirus sh-RNA (*short hairpin RNA*) a été envisagée. En effet, il ne faut pas exclure le fait que comme les si-RNA sont transfectés de manière transitoire et très vite dégradés au sein de la cellule (pour revue, Rao et al., 2009), l'effet éventuel sur AcMet11-Tau, exprimée de manière stable dans toute la population cellulaire serait dilué et difficile à mettre en évidence. De plus, comme la N- α -acétylation est co-translationnelle, la réduction de la NatB doit être réalisée avant l'induction des transgènes afin de limiter le niveau de N- α -acétylation avant le début de la traduction de Met11-Tau. Ainsi, après avoir réalisé des mises au point sur le titre infectieux à utiliser, trois lentivirus sh-RNA différents dirigés contre la sous-unité Naa20 ont été utilisés dans les lignées cellulaires SH-SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R. La sélection des cellules ayant intégré le lentivirus sh-RNA a été réalisée et l'efficacité d'inhibition de l'expression de la sous-unité Naa20 a été analysée par WB. Les résultats ont montré que parmi les trois lentivirus shRNA-Naa20, seul le lot3 montre une très forte diminution du niveau d'expression de la sous-unité Naa20, observée par rapport à la condition non infectée (résultats non montrés). Ainsi, la génération des lignées stables pour l'invalidation de la sous-unité Naa20 (SH-SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R shRNA-Naa20) va permettre de valider ou non l'implication de la NatB vis-à-vis de la N- α -acétylation de la forme tronquée Met11-Tau. Pour cela, l'expression des transgènes de ces lignées a été induite pendant 24 heures. Les résultats par WB en utilisant l'anticorps Nat5 montrent un niveau d'expression diminué de la sous-unité Naa20 par rapport à la condition non infectée (NI) (**Figure 50**). Ensuite l'effet de cette diminution a été évalué vis-à-vis de la forme tronquée AcMet11-Tau, l'immuno-empreinte utilisant

l'anticorps 2H2/D11 tout comme l'anticorps Tau-Cter révèle une diminution de l'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau en présence du lentivirus shRNA-Naa20 par rapport à la condition NI représentant le niveau d'expression de base. Ces résultats restent à confirmer mais ils permettent d'appuyer le résultat obtenu lors de la surexpression de la NatB où une augmentation du niveau d'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau avait été observée.

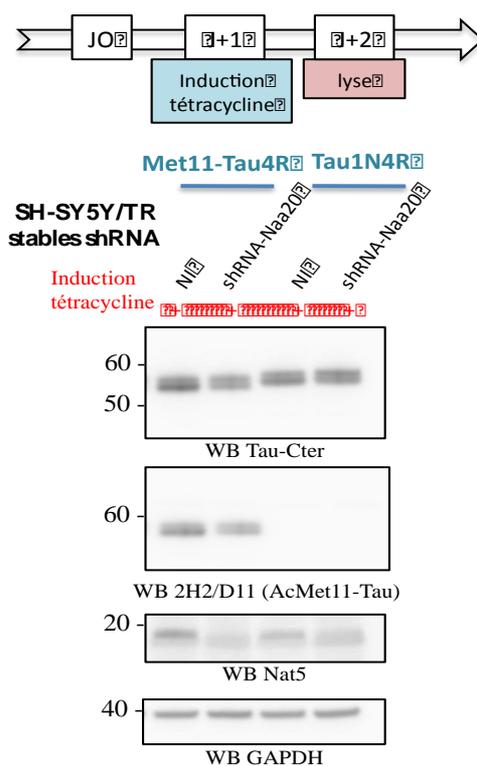


Figure 50 – Réduction du taux de la sous-unité catalytique de la NatB (Naa20) par la méthode de lentivirus sh-RNA. Figure représentative de l'analyse par immuno-empreinte de la baisse du taux de la Naa20 après infection de lentivirus sh-RNA stablement dans les lignées cellulaires SH-SY5Y/TR Tau1N4R et Met11-Tau4R. Après 24 heures d'induction de l'expression des transgènes, l'immuno-empreinte utilisant l'anticorps Nat5 montre la réduction du niveau de la Naa20 en présence du shRNA-Naa20 par rapport à la condition non infectée (NI). L'immunoempreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter montre l'expression des protéines Tau1N4R et Met11-Tau4R après induction. Et l'immuno-empreinte utilisant l'anticorps 2H2/D11 montre une diminution d'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau lors de la réduction par shRNA de la Naa20 par rapport au à la condition NI. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés (contre quinze microgrammes pour l'anticorps Nat5) et l'immunoréactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

Ainsi, ces outils permettent de moduler le niveau de N- α -acétylation de la forme tronquée Met11-Tau dans le but d'étudier le rôle de cette modification sur la forme tronquée Met11-Tau par rapport à la protéine Tau entière. En effet, de nombreux rôles sont décrits dans la littérature pour cette modification, vis-à-vis de la protéine Tau elle pourrait moduler sa localisation subcellulaire, sa stabilité protéique ou bien même son agrégation.

C. Quelles sont les rôles de la N- α -acétylation sur la forme tronquée Met11-Tau par rapport à la protéine Tau entière ?

De nombreux rôles sont décrits pour la N- α -acétylation dans la littérature, elle intervient dans la stabilité et la dégradation protéique, les interactions protéine/protéine, la localisation subcellulaire et la conformation des protéines. Ainsi, en parallèle de la génération des outils permettant la modulation du niveau de N- α -acétylation ; des études concernant la stabilité protéique ont été débutées dans les lignées cellulaires stables et inductibles. Dans un premier temps, les doses nécessaires et non toxiques ont été déterminés pour la drogue utilisée qui est la Cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la biosynthèse des protéines de novo, utilisée pour évaluer la stabilité des protéines. Après cette mise au point, les différentes lignées cellulaires stables et inductibles ont été traitées pendant 24 heures avec la CHX après 24 heures d'induction de l'expression. L'efficacité du traitement est vérifié par le marqueur CyclinD1, une protéine impliquée dans le cycle cellulaire et possédant une demi-vie très courte. En effet, en comparant le niveau d'expression de base de la CyclinD1 dans la condition non traitée (DMSO, Diméthylsulfoxyde) avec la condition traitée (CHX), l'expression de la CyclinD1 n'est plus détectée. L'immuno-empreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter et l'anticorps Tau5 révèle une baisse du Taux des protéines Tau1N4R, Met11-Tau4R, Tau1N3R et Met11-Tau3R lors du traitement avec la CHX par rapport à la condition non traitée (**Figure 51**).

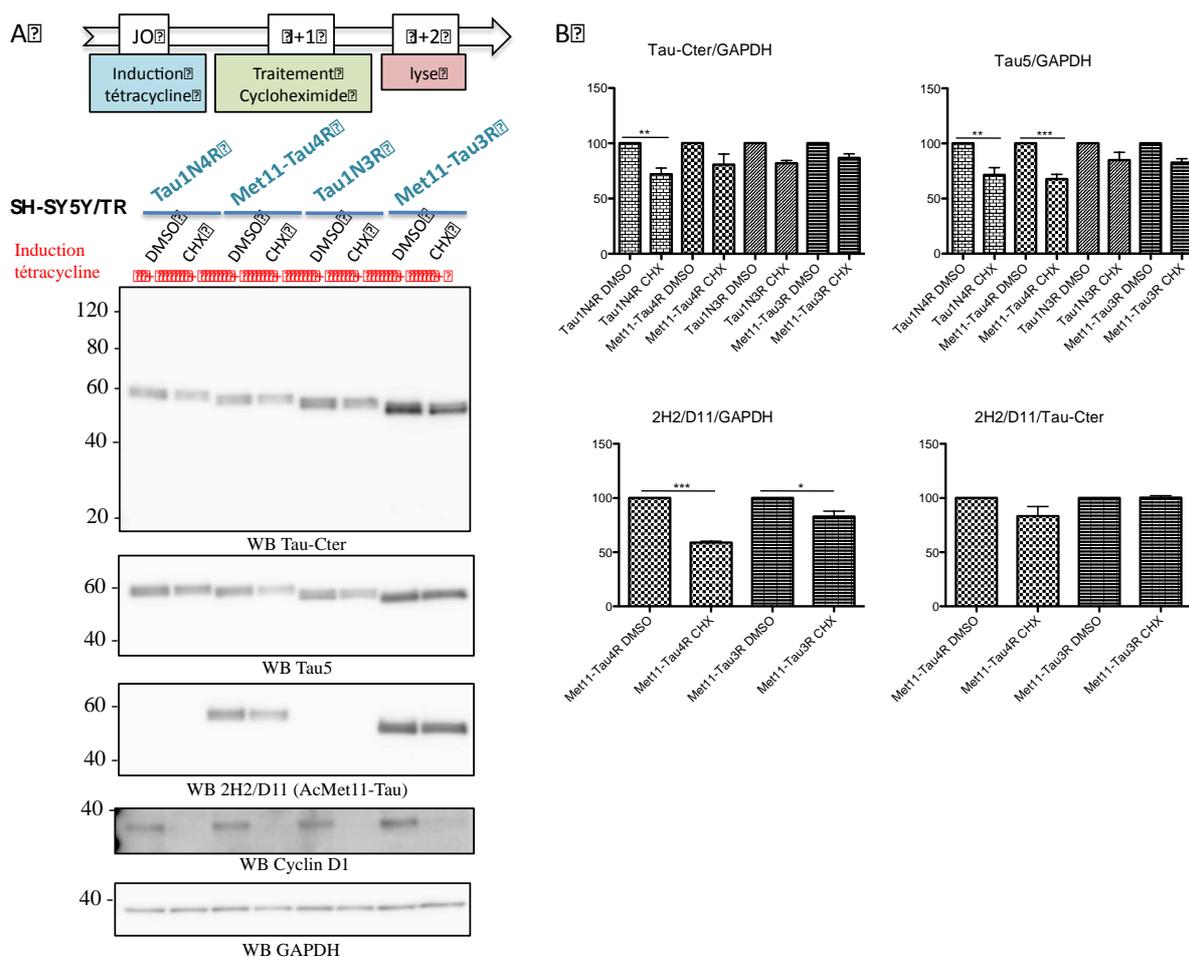


Figure 51 – Implication potentielle de la N- α -acétylation dans la stabilité protéique de la forme tronquée Met11-Tau. (A) Figure représentative de l'analyse par immunoempreinte de l'expression des protéines Tau entières et des formes tronquées dans le contexte de 2 isoformes protéiques. L'analyse est réalisée après induction à la tétracycline et traitement avec la Cycloheximide (CHX à 20 μ g/mL) dans les lignées cellulaires stables et inductibles. L'immunoempreinte utilisant l'anticorps Tau-Cter et Tau5 montre une diminution de l'expression de toutes les protéines avec le traitement CHX par rapport à la condition DMSO. Et l'immunoempreinte utilisant l'anticorps 2H2/D11 montre également une diminution de la forme tronquée AcMet11-Tau dans le contexte des isoformes 3R et 4R. Cependant, la forme tronquée AcMet11-Tau3R semble plus stable. L'efficacité du traitement CHX sur l'inhibition de la synthèse protéique est montré par l'utilisation de la cyclinD1, une protéine possédant une demi-vie très courte. Dix microgrammes de protéines extraites sont déposés et l'immunoréactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification en pourcentage du taux d'expression des différentes protéines Tau en condition non traitée et avec le traitement CHX (n=3). Les barres d'erreurs indiquent l'erreur type (SEM). (*) p< 0.05. (**) p<0.01. (***) p< 0.001. Les différences entre les valeurs moyennes ont été déterminées par une analyse *one way* ANOVA suivie d'un test *post-hoc* LDS Fischer.

Cependant, la baisse du niveau protéique est moins importante pour la forme tronquée Met11-Tau3R comparativement aux autres espèces de Tau. Par la suite, l'utilisation de l'anticorps 2H2/D11 met en avant la même observation, en effet, la baisse du niveau de la forme tronquée AcMet11-Tau est plus importante dans le contexte de l'isoforme 4R que de l'isoforme 3R. Ces résultats suggèrent que la forme tronquée Met11-Tau3R est plus stable que la protéine Tau entière et que la forme tronquée Met11-Tau4R. Cette différence est-elle due à la N- α -acétylation ? En effet, des différences sont également observées lors de l'observation des formes tronquées AcMet11-Tau. Afin de répondre à cette question, la même cinétique de traitement sera réalisée en modulant le niveau de modulation de la N- α -acétylation grâce aux outils développés vis-à-vis de la NatB.

Afin de réaliser la caractérisation fonctionnelle de la forme tronquée Met11-Tau et de déterminer le rôle de la N- α -acétylation, des outils moléculaires permettant de moduler le niveau de N- α -acétylation ont été générés. En effet, la forme tronquée Met11-Tau serait substrat de la NatB, ainsi en utilisant des approches de surexpression et d'inhibition de cette enzyme, les résultats ont montré que la NatB semble être l'acteur de cette modification sur la forme tronquée Met11-Tau. Même si ces résultats restent à confirmer en utilisant les outils moléculaires développés, le début des études fonctionnelles montre une différence de stabilité protéique de la forme tronquée Met11-Tau dans le contexte de l'isoforme Tau1N3R. La N- α -acétylation étant une modification multifonctionnelle, il serait intéressant de regarder son effet sur l'agrégation et la localisation subcellulaire également vis-à-vis de la forme tronquée Met11-Tau.

Conclusion - Discussion

La protéine Tau est majoritairement exprimée au sein de la population neuronale, où elle joue un rôle principal dans l'intégrité du neurone. En effet, elle appartient à la famille des MAPs et sa fonction principale est de permettre la régulation de la dynamique microtubulaire. De nombreux autres rôles sont aujourd'hui décrits pour Tau, notamment dans la signalisation cellulaire, le transport axonal, la plasticité synaptique et la protection des acides nucléiques. Ainsi, la dérégulation de Tau est à l'origine de nombreux dysfonctionnements au sein du neurone. En effet, en addition de ses propriétés physiologiques, la protéine Tau est le dénominateur commun d'un groupe de maladies neurodégénératives appelées Tauopathies. Dans ces pathologies, les protéines Tau sont retrouvées agrégées et sous forme hyper- et anormalement phosphorylées. Bien que tous les mécanismes conduisant à l'agrégation de Tau ne sont pas élucidés, il apparaît clairement que les modifications post-traductionnelles jouent un rôle essentiel dans la modulation des fonctions de Tau et de ses rôles dans les pathologies. Bien que la phosphorylation de Tau soit largement décrite en condition physiologique et pathologique, d'autres modifications post-traductionnelles semblent être impliquées dans les mécanismes conduisant à la pathologie Tau, notamment la troncation. En effet, l'analyse du tissu cérébral provenant de patients Alzheimer et d'autres Tauopathies montre la présence de nombreuses formes tronquées de Tau. Elles dériveraient d'une protéolyse partielle de la protéine Tau et sont caractérisées par des faibles poids moléculaires en comparaison avec la protéine Tau entière. Aujourd'hui l'identité de toutes ces formes tronquées ainsi que leurs rôles ne sont pas connus. Cependant, deux formes tronquées dans la partie carboxy-terminale de Tau ont été identifiées dans le tissu cérébral provenant de patients Alzheimer et sont bien caractérisées, il s'agit des formes tronquées se terminant par les résidus Glu391 et Asp421. Cette caractérisation a été possible grâce à la génération d'outils immunologiques spécifiques et de modèles transgéniques murins. Les études fonctionnelles ont notamment montré pour la forme tronquée se terminant par le résidu Asp421 : une co-localisation avec les neurones en DNF dans le tissu cérébral humain et murin, la génération de ce site de troncation par la caspase3 et une troncation qui semble être un événement précoce à la formation de la DNF. Aujourd'hui, certains travaux montrent qu'au contraire cette forme tronquée est une

conséquence de la pathologie et que cette espèce de Tau apparaît tardivement dans le processus pathologique (Leroy et al., 2007b ; Bondulich et al., 2016). Pour la forme tronquée se terminant par le résidu Glu391, les études dans le modèle de rat transgénique (Tau151-391) ont montré une capacité à induire une pathologie Tau caractérisée par une augmentation de la phosphorylation de Tau et une agrégation de la protéine Tau endogène avec cette forme tronquée. Ainsi, ces études révélaient que ces formes tronquées possèdent la caractéristique d'agent de nucléation capable d'entraîner leur propre agrégation et celle de la protéine Tau entière. En addition d'une troncation dans le domaine carboxy-terminal de Tau, des études ont révélé qu'une troncation dans le domaine amino-terminal avait également lieu dans la maladie d'Alzheimer. Ces résultats montrent un rôle pathologique pour certaines de ces formes tronquées, mais il ne peut pas être étendu à l'ensemble des formes tronquées. En effet, la troncation n'est pas exclusive à un domaine donné de Tau mais a lieu sur l'ensemble de la protéine, ainsi, en fonction du domaine affecté les conséquences fonctionnelles attendues peuvent être très variables. De plus, la majorité des études montre une implication dans la pathologie de la troncation de Tau, mais il n'est pas à exclure qu'elle pourrait jouer un rôle physiologique. L'identification des formes tronquées de Tau apparaît donc comme un enjeu principal afin de mieux comprendre les fonctions de ces formes tronquées et leurs intérêts dans la maladie d'Alzheimer et les autres Tauopathies.

C'est dans ce contexte que de nouvelles formes tronquées de Tau dans la partie amino-terminale ont été identifiées au sein de l'équipe. Pour cela une approche protéomique de spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a été utilisée sur des extraits de tissus cérébraux humains enrichis en protéines Tau (Derisbourg et al., 2015). Parmi toutes les formes tronquées identifiées, ce travail de thèse s'inscrit dans l'étude de la forme tronquée débutant par l'acide aminé Met11 (Met11-Tau). Pourquoi étudier particulièrement cette forme tronquée Met11-Tau ? : 1) les fonctions du domaine amino-terminal de Tau ne sont pas aussi bien caractérisées que celles du domaine carboxy-terminal, ainsi l'étude de cette forme tronquée permettra de mieux connaître le domaine amino-terminal de Tau ; 2) la forme tronquée Met11-Tau a également été

identifiée N- α -acétylée (AcMet11-Tau), et cette modification n'a jamais été décrite pour Tau. Du fait que Tau est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles, la détermination du rôle de cette modification est importante afin de mieux comprendre sa régulation de Tau et 3) il est montré que des modifications dans la partie amino-terminale de Tau peuvent avoir des conséquences pathologiques, quel est donc l'impact de la délétion des 10 premiers acides aminés de Tau et de la N- α -acétylation sur les propriétés de Tau ?

A. La génération d'outils nécessaires à l'étude de la forme tronquée Met11-Tau N- α -acétylée (AcMet11-Tau) et non modifiée

Afin de répondre à toutes les questions posées et mener à bien cette étude, différents outils ont été générés. Notamment des lignées cellulaires stables et inductibles, exprimant la protéine Tau entière sous formes des deux isoformes majoritaires dans le cerveau humain (Tau1N4R et Tau1N3R) ou la forme tronquée Met11-Tau dans le contexte de ces deux mêmes isoformes (Met11-Tau4R et Met11-Tau3R). L'avantage de ce modèle est de contrôler l'expression des transgènes afin d'éviter une expression constitutive qui pourrait entraîner des phénomènes de toxicité. De plus, les effets de la forme tronquée Met11-Tau sont comparés à la protéine Tau entière dans le contexte de deux isoformes. Au sein de ces lignées cellulaires, la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau a été vérifiée par LC-MS/MS. Nos résultats ont montré que dans les deux lignées surexprimant les formes tronquées Met11-Tau4R et Met11-Tau3R, la forme tronquée Met11-Tau est retrouvée sous formes N- α -acétylée et non modifiée. Cette méthode de protéomique n'étant ni quantitative ni reproductible, et afin de parfaire les études de la forme tronquée Met11-Tau et AcMet11-Tau, la génération d'un anticorps monoclonal dirigé contre la forme tronquée AcMet11-Tau a été entreprise. Dès l'obtention de cet anticorps dénommé 2H2/D11, la caractérisation de sa spécificité par analyses ELISA et WB a été validée par les expériences d'immunodéplétion qui ont montré que l'anticorps 2H2/D11 reconnaît bien spécifiquement la forme tronquée AcMet11-Tau. Ainsi, l'obtention de

cet anticorps représentait un réel atout pour réaliser les études fonctionnelles et les études associatives de cette nouvelle forme tronquée de Tau N- α -acétylée avec la pathologie Tau dans les tissus cérébraux.

B. La caractérisation fonctionnelle de la forme tronquée Met11-Tau et du rôle de la N- α -acétylation

B.1. Les fonctions du domaine amino-terminal de Tau ne sont pas encore clairement déterminées

Des premières études avaient été réalisées pour la forme tronquée Met11-Tau vis-à-vis de la régulation de la dynamique microtubulaire. Ces études menées dans un modèle de neuroblastome murin en surexpression transitoire n'avaient pas montré de différence de comportement entre la protéine Tau entière (Tau1N4R) et la forme tronquée Met11-Tau (Derisbourg et al., 2015). Alors que pour la forme tronquée Gln124-Tau, il a été montré que la délétion des 123 premiers acides aminés entraînait une augmentation du niveau d'acétylation de l' α -tubuline, une augmentation de l'affinité de cette forme tronquée pour les microtubules et une meilleure résistance à la dépolymérisation microtubulaire. Ainsi, ces résultats montrent qu'en comparaison à la protéine Tau entière, la forme tronquée Gln124-Tau possède un gain de fonction et que le domaine amino-terminal de Tau était impliqué dans la régulation de la dynamique microtubulaire. Ainsi, en fonction de la localisation du site de troncation sur Tau, les conséquences fonctionnelles attendues sont variables comme le montrent ces résultats et d'autres résultats de la littérature. En effet, des modifications situées dans le domaine amino-terminal de Tau ont des effets opposés : la mutation R5H ou R5L retrouvée dans les DFTP-17 entraîne une diminution de la polymérisation des microtubules *in vitro* (Hayashi et al., 2002 ; Poorkaj et al., 2002) alors que la mutation G55R retrouvée dans la PSP la favorise (Iyer et al., 2013). Il est également montré que la forme tronquée débutant au résidu Arg242 n'est plus capable de promouvoir l'assemblage des microtubules et possède une capacité d'agrégation rapide (Matsumoto et al., 2015). De plus, de nombreuses autres implications de la délétion du

domaine amino-terminal de Tau sont décrites dans la littérature malgré le fait que les fonctions spécifiques de ce domaine ne soient pas franchement établies. En effet, le domaine amino-terminal projette vers l'extérieur des microtubules et régule indirectement l'espacement entre les microtubules (Chen et al., 1992) ainsi que sa liaison avec des partenaires protéiques tels que l'annexine A2 et la dynactine (Gauthier-Kemper et al., 2016 ; Magnani et al., 2007). Concernant la région amino-terminale comprise entre les résidus Ala2 et Tyr18 de Tau, il a été montré qu'elle correspondait à un « domaine d'activation des phosphatases », notamment de PP1 (*Protein Phosphatase 1*) qui a pour conséquence une inhibition du transport axonal. Cette inhibition est empêchée lors de la phosphorylation du résidu Tyr18 (Kanaan et al., 2011 ; Kanaan et al., 2012).

Toutes ces études mettent en avant que des modifications du domaine amino-terminal (troncation, mutation et phosphorylation) peuvent avoir des effets néfastes sur les fonctions de Tau ou bien au contraire des effets favorables. Ainsi, les conséquences fonctionnelles de la délétion des 10 premiers acides aminés de Tau dans la forme Met11-Tau restent à déterminer et à comparer avec la protéine Tau entière.

B.2. Quel est le ou les rôle(s) de la N- α -acétylation sur la protéine Tau ?

A la suite de l'identification de la forme tronquée Met11-Tau, nous avons également montré que celle-ci est retrouvée N- α -acétylée. Afin de déterminer le rôle de cette modification, très répandue chez les eucaryotes, sur la forme tronquée Met11-Tau, des outils moléculaires devaient être générés. Après avoir vérifié que les lignées cellulaires SH-SY5Y/TR Met11-Tau4R et Met11-Tau3R exprimaient les formes tronquées AcMet11-Tau4R et AcMet11-Tau3R, respectivement, des stratégies de modulation du niveau de N- α -acétylation ont été utilisées. Cette modification étant sous le contrôle des Nats, chaque Nat ayant une spécificité de substrat particulier, la NatB semblait être l'enzyme potentiellement responsable.

Dans un premier temps, une approche de surexpression de la sous-unité catalytique de la NatB (Naa20) a été utilisée, malheureusement cette méthode n'a pas

permet de montrer de manière reproductible que la NatB était responsable de la N- α -acétylation de la forme tronquée Met11-Tau. En effet, l'augmentation du niveau d'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau n'était pas systématiquement observé dans les différentes expériences indépendantes. Plusieurs hypothèses étaient émises : 1) l'efficacité de transfection de la lignée SH-SY5Y qui est très faible, de l'ordre de 10-15% (Martin-Montanez et al., 2010) ; 2) le niveau de base de N- α -acétylation serait très élevé et il est peut être au seuil maximal dans certaines expériences, ce qui empêche d'observer un effet reproductible et 3) la N- α -acétylation est une modification majoritairement co-traductionnelle, ainsi la surexpression de la Naa20 doit être réalisée suffisamment longtemps avant l'induction de l'expression de la forme tronquée Met11-Tau. Ainsi, nous avons entrepris par la suite différentes approches d'inhibition de l'expression de la Naa20, la méthode d'inhibition stable par infection lentivirale via des shRNANaa20 a été retenue. Elle présente plusieurs avantages : 1) l'efficacité de transduction par l'infection est très élevée et 2) la génération de lignées stables pour le shRNA-Naa20 permet de s'affranchir d'un effet de dilution du shRNA puisque toutes les cellules expriment le shRNA-Naa20. Ainsi, par cette méthode, les résultats ont montré une diminution du niveau d'expression de la forme tronquée AcMet11-Tau en présence du shRNA-Naa20. Ces résultats restent à reproduire dans le but de confirmer que la NatB est bien responsable de la N- α -acétylation de la forme tronquée Met11-Tau. De plus cet outil permettra d'analyser le ou les rôle(s) de la N- α -acétylation sur la forme tronquée Met11-Tau.

En effet, de nombreux rôles sont décrits pour la N- α -acétylation, selon la protéine cible. Elle intervient dans la régulation de l'interaction entre protéines (Polevoda et al., 2003b ; Scott et al., 2011), la localisation subcellulaire des protéines (Behnia et al., 2004 ; D'hondt et al., 2013 ; Forte et al., 2011), la conformation des protéines (Arnesen et al., 2010) et la dégradation/stabilité protéique (Kuo et al., 2004 ; Varshavsky, 2008). Ainsi, la stabilité protéique de la forme tronquée Met11-Tau a été étudiée dans le contexte de l'isoforme 3R et 4R. Nos résultats ont montré une plus forte stabilité de la forme tronquée Met11-Tau3R par rapport à la protéine Tau1N3R et également par rapport à la forme tronquée Met11-Tau4R. Comme dans ces cellules la

proportion relative de la forme Met11-Tau acétylée et non acétylée n'est pas connue, la modulation du niveau de N- α -acétylation permettra de montrer si cette différence est liée à la délétion des 10 premiers acides aminés de Tau ou bien à la N- α -acétylation. De plus, d'autres rôles de la N- α -acétylation seront explorés notamment pour la dégradation protéique ; des études ont montré que la protéine Tau physiologique était majoritairement dégradée par le protéasome (UPS) (David et al., 2002 ; Lee et al., 2013). De plus, il a été montré que la troncation avait un impact sur la dégradation de Tau, notamment en entraînant un dysfonctionnement des voies de dégradation (Bondulich et al., 2016 ; Dolan and Johnson, 2010). Ainsi se pose la question de est-ce que la N- α -acétylation a un impact sur la dégradation de la forme tronquée AcMet11-Tau ? Il serait également intéressant d'observer si la forme tronquée AcMet11-Tau peut avoir une localisation cellulaire différente de la protéine Tau entière. En effet, en plus d'être cytosolique, la protéine Tau est retrouvée dans le compartiment nucléaire sous forme déphosphorylée (Guo et al., 2017) et également dans le milieu extracellulaire sous forme déphosphorylée et tronquée dans la partie carboxy-terminale (Plouffe et al., 2012 ; Pooler et al., 2013).

En addition des rôles que peut jouer la N- α -acétylation sur la forme tronquée Met11-Tau, il faut également noter que les études sur la stabilité protéique avaient montré une différence entre la forme tronquée Met11-Tau4R et Met11-Tau3R. Ces résultats laissent à penser que la nature de l'isoforme peut moduler les propriétés de la forme tronquée Met11-Tau et AcMet11-Tau. En effet, il serait intéressant de réaliser les études fonctionnelles dans le cadre des six isoformes de Tau. Dans la littérature, il est notamment décrit que les isoformes 4R permettent une meilleure stabilisation des microtubules que les isoformes 3R (Goedert and Jakes, 1990). Concernant les isoformes 0N, 1N et 2N, il a été montré dans le tissu cérébral murin que les isoformes 1N sont enrichis dans le compartiment nucléaire des neurones alors que les isoformes 0N et 2N sont plutôt localisés dans l'axone et les dendrites (Liu and Gotz, 2013). La question qui se pose est : est ce que l'impact de la N- α -acétylation sur Met11-Tau dépend de la nature de l'isoforme ?

C. Association de la forme tronquée AcMet11-Tau avec la pathologie Tau

Pour rappel, la forme tronquée AcMet11-Tau a été identifiée par une approche protéomique au sein de lignées cellulaires surexprimant la protéine Tau et au sein du tissu cérébral provenant d'un patient Alzheimer de stade Braak III. Ainsi, l'identification de cette forme tronquée avait été initiée dans un contexte strictement pathologique mais il ne fallait pas exclure le fait qu'elle ne puisse pas être présente dans un contexte non pathologique. Ainsi, l'anticorps monoclonal (2H2/D11) développé et reconnaissant spécifiquement la forme tronquée AcMet11-Tau a permis de réaliser une analyse d'association de cette espèce de Tau avec la pathologie Tau. En effet, nos résultats ont montré que la forme tronquée AcMet11-Tau était retrouvée dans l'hippocampe du modèle transgénique murin Thy-Tau22, sans aucune détection chez les souris WT. Nous avons montré que la forme tronquée AcMet11-Tau était localisée dans les neurones en DNF et co-localisait avec une espèce de Tau pathologique phosphorylée en Ser422. De plus, cette nouvelle forme de Tau est détectée à un stade précoce de la pathologie, suggérant son implication dans le développement du processus pathologique. En addition de ces observations chez la souris, l'étude du tissu cérébral humain a montré que la forme tronquée AcMet11-Tau était détectée dans l'hippocampe, le cortex temporal et le cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, sans aucune détection dans le tissu cérébral provenant de sujets sains. Ainsi, nos résultats permettent de valider que la forme tronquée AcMet11-Tau est retrouvée dans un contexte de pathologie Tau.

Par ailleurs, les résultats de nos études immunohistochimiques ont montré que la forme tronquée AcMet11-Tau dans l'hippocampe de souris Thy-Tau22 n'est pas restreinte à une seule zone hippocampique. En effet, en plus d'être localisée dans la CA1 sous forme d'un marquage de neurones en DNF, un marquage est observé dans la CA3, le gyrus denté et les fibres moussues (axones projetant du gyrus denté vers la CA3). En comparaison avec la littérature, des études ont révélé un dysfonctionnement synaptique dans cette région hippocampique chez des modèles transgéniques de pathologie Tau (Decker et al., 2015). Le gyrus denté correspond à un centre intégrateur d'information et il constitue, en addition de la zone sous-granulaire, une

niche de progéniteurs neuronaux (Piatti et al., 2013). Ainsi son altération a pour conséquence un dysfonctionnement des connexions synaptiques avec le reste des régions hippocampiques entraînant l'apparition de problèmes mnésiques ; ainsi qu'une dérégulation de la neurogenèse, il est notamment décrit dans la maladie d'Alzheimer un défaut de maturation des progéniteurs (Li et al., 2008). La forme tronquée AcMet11-Tau intervient-elle dans ce dysfonctionnement synaptique du fait de sa présence dans le gyrus denté ? En effet, il est bien décrit que la protéine Tau intervient dans l'altération des processus synaptiques dans la maladie d'Alzheimer (Jahdavi et al., 2015). Pour répondre à cette question, des études préliminaires *in vivo* menées au laboratoire dans le modèle transgénique murin Thy-Tau30 ont été réalisées. Ce modèle présente l'avantage de développer une pathologie Tau dès l'âge de 3 mois (Leroy et al., 2007b ; Schindowski et al., 2006). Ainsi, des injections stéréotaxiques, dans l'hippocampe de souris Thy-Tau30 âgée de 1 mois, via des vecteurs lentiviraux codant pour la protéine Tau1N4R et la forme tronquée Met11-Tau4R ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment (Caillierez et al., 2013). Après vérification de la bonne expression des transgènes 2 mois post-injection, l'utilisation de l'anticorps 2H2/D11 a montré une forte expression de la forme tronquée AcMet11-Tau chez les souris Thy-Tau30 injectées avec le lentivirus Met11-Tau4R. Cette expression est notamment détectée dans la CA1, la CA3, le gyrus denté et les FM (observations identiques chez le modèle Thy-Tau22). Ces études *in vivo* pourront permettre l'évaluation de l'impact de la forme tronquée AcMet11-Tau sur la transmission synaptique et les capacités mnésiques. Pour cela, l'utilisation des lentivirus shRNA-Naa20 dans ce modèle permettra de déterminer si les effets observés sont la cause de cette modification ou bien de la délétion des 10 premiers acides aminés de Tau. Par ailleurs, un groupe a récemment montré que le domaine amino-terminal de Tau lie les vésicules synaptiques, ainsi sa délétion peut entraîner des conséquences indirectes sur la transmission synaptique (Zhou et al., 2017).

En addition de la potentielle implication de la forme tronquée AcMet11-Tau dans la transmission synaptique, les études immunohistochimiques chez la souris Thy-Tau22 ont également montré que celle-ci était présente dans les cellules pyramidales

de la CA1 sous forme d'un marquage compact des corps cellulaires, qui est typique des neurones en DNF. De plus, le nombre de neurones en DNF marqués semblait augmenter avec l'âge, suggérant un rôle potentiel de la forme tronquée AcMet11-Tau dans la formation des agrégats de Tau. En effet, il est décrit dans la littérature que des formes tronquées de Tau déléetées de leur partie carboxy-terminale sont capables de se comporter comme des agents de nucléation en recrutant la protéine Tau endogène dans les agrégats, dans des modèles *in vivo* (Zilka et al., 2006). En effet la troncation démasque les motifs pro-agrégatifs « PHF6 et PHF6* » qui en condition physiologique peuvent être masqués grâce à la conformation type « thrombone » de Tau (Jeganthan et al., 2006). Il a notamment été montré une capacité de ces espèces à augmenter la vitesse de fibrillogénèse de la protéine Tau entière (Ozcelik et al., 2016 ; Yin and Kuret, 2006). Afin de vérifier cette hypothèse, des souris WT et des souris transgéniques Thy-Tau30 ont été injectées avec le lentivirus Met11-Tau. Alors qu'aucun marquage de neurones en DNF n'a été observé à 4 mois post-injection dans les souris WT, une augmentation du nombre de neurones en DNF a été observée dans les souris transgéniques. Sur la base de ces résultats, Il ne faut pas exclure que la forme tronquée Met11-Tau/AcMet11-Tau ne peuvent pas s'agréger toutes seules dans les souris WT, en effet des cinétiques plus longues (8 et 12 mois post-injection) sont probablement nécessaires pour observer un effet. Ainsi, les études à venir permettront de valider si la forme tronquée AcMet11-Tau est capable de potentialiser la pathologie Tau et si elle peut être considérée comme un agent de nucléation des autres espèces Tau. De plus, les analyses par dosage ELISA des extraits d'hippocampe du modèle Thy-Tau22 ont montré que la forme tronquée AcMet11-Tau est détectée dès l'âge de 3 mois, âge où la pathologie Tau n'a pas débuté dans ce modèle, et sa détection augmente avec l'âge (résultats non publiés). Ainsi, la présence de cette espèce de Tau précède la DNF et les troubles mnésiques associés (Van der Jeugd et al., 2011). A la vue de ces observations, la forme tronquée AcMet11-Tau pourrait donc jouer un rôle dans l'initiation de la pathologie Tau et/ou les perturbations de la transmission synaptique.

La forme tronquée AcMet11-Tau est au centre de nombreuses interrogations, étant nouvellement identifiée, elle représente un potentiel outils de diagnostic et une cible thérapeutique. En effet, les résultats sur le tissu cérébral humain ont montré que la forme tronquée AcMet11-Tau était détectée au sein de différentes régions cérébrales provenant de patients Alzheimer (cortex temporal, cortex frontal et hippocampe). En revanche, l'analyse préliminaire de régions cérébrales (cortex frontal, mésencéphale) provenant de patients atteints d'autres Tauopathies (FTDP-17, Pick et PSP) n'a pas montré la présence de la forme tronquée AcMet11-Tau au sein de ces échantillons. D'autres régions cérébrales restent à analyser (hippocampe, cortex temporal) afin de conclure quand à l'absence de détection de la forme tronquée AcMet11-Tau et son association spécifique avec la maladie d'Alzheimer. En effet, il est montré dans la littérature que des modifications dans le domaine amino-terminal ont lieu avant le développement de la pathologie ; par exemple le « domaine d'activation des phosphatases » est précocement exposé dans la maladie d'Alzheimer (Combs et al., 2016). De plus, il a été montré que cet événement était commun à d'autres Tauopathies (Pick, PSP et DCB) (Combs et al., 2017). Ainsi, sur la base de ces résultats, il semblerait que la forme tronquée AcMet11-Tau soit spécifiquement associée à la maladie d'Alzheimer. Son apparition peut-elle être corrélée aux stades de la pathologie ? En effet, les tissus cérébraux provenant de patients Alzheimer utilisés sont principalement à des stades avancés de la pathologie (Braak V et VI), il serait donc intéressant de réaliser une analyse approfondie de la forme AcMet11-Tau dans les différents stades de Braak. En addition des tissus cérébraux, les LCR de patients Alzheimer pourraient être analysés afin d'observer si la forme tronquée AcMet11-Tau possède une capacité de sécrétion. En effet, il est décrit dans la littérature que des protéines Tau entières et tronquées sont présentes dans le LCR (Johnson et al., 1997). Ainsi, la forme tronquée AcMet11-Tau pourrait représenter un outils potentiel de diagnostic. En addition, la forme tronquée AcMet11-Tau peut représenter une cible thérapeutique, en effet, l'anticorps monoclonal 2H2/D11 pourrait être utilisé pour évaluer une stratégie d'immunothérapie passive. L'avantage de cette technique est de cibler un épitope pathologique d'une protéine d'intérêt sans risque d'endommager sa forme physiologique (Lemere and Masliah, 2010). Au sein du laboratoire, l'utilisation

dans les souris Thy-Tau22 d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée en Ser422 de Tau a montré une amélioration des fonctions cognitives et une réduction de la protéine Tau phosphorylée en Ser422 (Troquier et al., 2012). De plus, une étude récente a montré que l'utilisation d'un anticorps ciblant les acides aminés en position 6-18 de Tau dans le modèle transgénique 3xTg-AD, permettait de diminuer le niveau de protéines Tau hyperphosphorylées et d'APP (Dai et al., 2017). Ces résultats encourageants montrent que le ciblage du domaine amino-terminal de Tau semble important pour moduler la pathologie Tau.

D. Mécanisme Potentiel de génération de la forme tronquée Met11-Tau

Les formes tronquées de Tau peuvent être générées par différentes protéases, notamment les caspases ; certaines ont d'ailleurs été associées à des sites de troncation particuliers (Hanger and Wray, 2010). En analysant la séquence protéique environnante de la Met11 de Tau, aucun site consensus pour les caspases n'est présent sur cette partie amino-terminale de Tau (*PeptideCutter*, *ExPASy*). L'analyse de la séquence d'ARNm de Tau montre que l'ATG codant la Met1 de Tau est dans le même contexte que l'ATG codant la Met11. En effet, ces deux ATG sont dans la même séquence consensus minimale nommée séquence Kozak, cette séquence favorise l'initiation de la traduction à partir de l'ATG (Kozak, 1987). Ainsi, l'hypothèse serait que la forme tronquée Met11-Tau pourrait être le produit d'un site alternatif de traduction plutôt que le produit d'un clivage protéolytique. Ce mécanisme de régulation de la traduction est décrit pour un certain nombre de protéines, par exemple le facteur de transcription p53 possède un site alternatif de traduction qui produit une forme tronquée dans la partie amino-terminale qui possède des propriétés fonctionnelles différentes de la protéine entière (Courtois et al., 2002 ; Yin et al., 2002). Par ailleurs, la forme tronquée Met11-Tau est également N- α -acétylée ; comme la N- α -acétylation est majoritairement réalisée de manière co-traductionnelle, il faut donc que la génération de la forme tronquée Met11-Tau ne soit pas issue d'une modification post-traductionnelle comme la majorité des formes tronquées suite à

l'action de protéases. Ainsi, ce mécanisme de génération n'a pas encore été étudié, mais les résultats d'identification de la forme tronquée Met11-Tau avaient montré que celle-ci pouvait vraisemblablement être générée à partir de la séquence codante de protéine Tau entière, dans le contexte d'une séquence Kozak minimale. En effet, elle avait été identifiée au sein de la lignée SH-SY5Y surexprimant la protéine Tau1N4R ainsi que dans les souris transgéniques Thy-Tau 22 et Thy-Tau30. Pour les études cellulaires réalisées dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons généré une nouvelle lignée SH-SY5Y/TR Tau1N4R ; dans cette lignée l'ADNc de Tau1N4R avait été modifié de façon à ce que la forme tronquée Met11-Tau ne puisse pas être générée. En effet, afin de comparer les effets de la forme tronquée Met11-Tau par rapport à la protéine Tau entière, une séquence Kozak parfaite a été insérée en amont de l'ATG codant la Met1 de Tau. Ainsi, les études pour comprendre le mécanisme de génération de la forme tronquée Met11-Tau seront réalisées dans la lignée SH-SY5Y avec différentes constructions plasmidiques contenant les ADNc et la région 5'UTR de la protéine Tau entière mutée soit sur le premier ATG ou bien l'ATG codant la Met11.

E. Perspectives de travail dans les modèles animaux : mieux comprendre le comportement de la forme tronquée Met11-Tau et le rôle de la N- α -acétylation

Sur la base de nos résultats quant à l'association de la protéine AcMet11-Tau à la pathologie Tau, les perspectives de cette étude sont d'établir le lien de cause à effet entre la forme Met11-Tau et la pathologie Tau et d'évaluer plus particulièrement le rôle de AcMet11-Tau dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer. 1) Afin d'observer le potentiel pathogénique de la protéine Met11-Tau, indépendamment de son état de N- α -acétylation, la forme tronquée Met11-Tau sera exprimée dans l'hippocampe de souris WT par injection stéréotaxique de vecteurs lentiviraux. De plus, deux groupes de souris contrôles seront utilisés (injection PBS et protéine Tau1N4R) dans le but de distinguer l'effet propre à la nature de la forme tronquée Met11-Tau (effet de la délétion des 10 premiers acides aminés de Tau et/ou la N- α -acétylation) de l'effet qui serait juste lié à l'expression de la protéine Tau

humaine. Des analyses biochimiques, immunohistologiques, comportementales et électrophysiologiques seront réalisées afin d'établir si la forme tronquée Met11-Tau, en comparaison à la protéine Tau entière entraîne une pathologie Tau et un trouble du comportement, sous-tendu par un dysfonctionnement de la plasticité synaptique. 2) Afin d'évaluer l'impact pathogénique de la N- α -acétylation de la forme tronquée Met11-Tau, le modèle transgénique murin Thy-Tau22 sera utilisé. En effet, au sein de ce modèle transgénique, la forme tronquée AcMet11-Tau a été détectée dans les neurones en DNF de l'hippocampe, et ce dès l'âge de 3 mois. De plus, ce modèle développe une pathologie Tau hippocampique et des altérations mnésiques progressives, démarrant aux alentours de 3 mois et maximales vers 9-10 mois. Ces altérations mnésiques sont sous-tendues par des altérations de la plasticité synaptique. Ainsi, pour évaluer l'impact de la forme tronquée AcMet11-Tau sur l'évolution physiopathologique des souris Thy-Tau22, des stratégies d'inhibition/blocage de la N- α -acétylation de la forme tronquée Met11-Tau seront réalisées, soit : A) par une approche d'inhibition de la sous-unité catalytique Naa10 de la NatB par injection stéréotaxique dans l'hippocampe de vecteurs lentiviraux shRNA ; les effets de la réduction de la sous-unité catalytique Naa10 seront évalués à un âge auquel ce modèle transgénique présente une pathologie Tau hippocampique et des troubles mnésiques ; B) soit par une approche basée sur l'injection dans l'hippocampe de l'anticorps 2H2/D11 spécifique de la forme tronquée AcMet11-Tau. Des analyses biochimiques, immunohistologiques, comportementales et électrophysiologiques seront réalisées dans le but d'observer si le blocage de la forme tronquée AcMet11-Tau peut permettre un effet bénéfique en termes de pathologie Tau et de troubles mnésiques associés. Mais également si la forme tronquée AcMet11-Tau peut présenter un potentiel en tant que cible thérapeutique.

Bibliographie

A

Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW, Kuret J, Binder LI (2000) C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 113 Pt 21:3737–3745.

Aguzzi A & Calella AM (2009) Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol. Rev.* 89: 1105–1152

Aksnes H, Hole K, Arnesen T (2015a) Molecular, cellular, and physiological significance of N-terminal acetylation. *Int Rev Cell Mol Biol.* 316:267-305.

Aksnes H, Van Damme P, Goris M, Starheim KK, Marie M, Støve SI, Hoel C, Kalvik TV, Hole K, Glomnes N, Furnes C, Ljostveit S, Ziegler M, Niere M, Gevaert K, Arnesen T (2015b) An organellar α -acetyltransferase, naa60, acetylates cytosolic N termini of transmembrane proteins and maintains Golgi integrity. *Cell Rep.* 10(8):1362-74.

Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

Amadoro G, Corsetti V, Sancesario GM, Lubrano A, Melchiorri G, Bernardini S, Calissano P, Sancesario G (2014) Cerebrospinal Fluid Levels of a 20-22 kDa NH2 Fragment of Human Tau Provide a Novel Neuronal Injury Biomarker in Alzheimer's Disease and Other Dementias. *J Alzheimers Dis.*

Ametzazurra A, Larrea E, Civeira MP, Prieto J, Aldabe R (2008) Implication of human N-alpha-acetyltransferase 5 in cellular proliferation and carcinogenesis. *Oncogene.* 27(58):7296-306.

Ametzazurra A, Gázquez C, Lasa M, Larrea E, Prieto J, Aldabe R (2009) Characterization of the human Nalpha-terminal acetyltransferase B enzymatic complex. *BMC. Proc.* 3 Suppl 6:S4.

Amos L, Schlieper D (2005). Microtubules and MAPs. *Advances in Protein Chemistry* 257–298

Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31:10626–10633.

Andreadis, A., Broderick, J.A., and Kosik, K.S. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res.* 23, 3585–3593.

Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739:91–103.

Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Nonaka T, Hasegawa M, Ishiguro K, Iritani S, Tsuchiya K, Iseki E, Yagishita S, Oda T, Mochizuki A (2004) Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration. *Ann Neurol* 55:72–79.

Arnesen T, Anderson D, Torsvik J, Halseth HB, Varhaug JE, Lillehaug JR (2006a) Cloning and characterization of hNAT5/hSAN: an evolutionarily conserved component of the NatA protein N-alpha-acetyltransferase complex. *Gene* 371(2):291-5.

Arnesen T, Gromyko D, Pendino F, Rynningen A, Varhaug JE, Lillehaug JR (2006b) Induction of apoptosis in human cells by RNAi-mediated knockdown of hARD1 and NATH, components of the protein N-alpha-acetyltransferase complex. *Oncogene* 25(31):4350-60.

Arnesen T (2009a) Protein N-terminal acetylation: NAT 2007-2008 Symposia. *BMC Proc.* 3 Suppl 6:S1.

Arnesen T, Van Damme P, Polevoda B, Helsens K, Evjenth R, Colaert N, Varhaug JE, Vandekerckhove J, Lillehaug JR, Sherman F, Gevaert K (2009b) Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(20):8157-62.

Arnesen T, Starheim KK, Van Damme P, Evjenth R, Dinh H, Betts MJ, Rynningen A, Vandekerckhove J, Gevaert K, Anderson D (2010) The chaperone-like protein HYPK acts together with NatA in cotranslational N-terminal acetylation and prevention of Huntingtin aggregation. *Mol Cell Biol.* 30(8):1898-909.

Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, Hart GW (1996) The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271:28741–28744.

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

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631– 639.

Asami M, Iijima K, Sumioka A, Iijima-Ando K, Kirino Y, Nakaya T, Suzuki T (2005) Interaction of N-terminal acetyltransferase with the cytoplasmic domain of beta-amyloid precursor protein and its effect on A beta secretion. *J Biochem.* 137(2):147-55.

Ashford JW, Kolm P, Colliver JA, Bekian C, Hsu LN. (1989). Alzheimer patient evaluation and the mini-mental state: item characteristic curve analysis. *J. Gerontol.* 44(5) :P139-46

Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., and Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 84, 361–384.

B

Bartels T, Kim NC, Luth ES, Selkoe DJ (2014) N-alpha-acetylation of α -synuclein increases its helical folding propensity, GM1 binding specificity and resistance to aggregation. *PLoS One.* 9(7):e103727.

Basurto-Islas G, Luna-Muñoz J, Guillozet-Bongaarts AL, Binder LI, Mena R, García-Sierra F (2008) Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:470–483.

Basurto-Islas G, Grundke-Iqbal I, Tung YC, Liu F, Iqbal K (2013) Activation of asparaginyl endopeptidase leads to Tau hyperphosphorylation in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry* 288:17495–17507.

Behnia R, Panic B, Whyte JR, Munro S (2004) Targeting of the Arf-like GTPase Arl3p to the Golgi requires N-terminal acetylation and the membrane protein Sys1p. *Nat Cell Biol.* 6(5):405-13.

Berry RW, Abraha A, Lagalwar S, LaPointe N, Gamblin TC, Cryns VL, Binder LI (2003) Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry* 42:8325–8331.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11, 153–163.

Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, García-Sierra F, Berry RW (2005) Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1739:216–223.

Blennow K, Zetterberg H, Fagan AM (2012) Fluid biomarkers in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006221–a006221.

Bloom GS, Luca FC, Vallee RB (1985) Microtubule-associated protein 1B : identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(16) :5404-8

Bloom GS (2014) Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol.* 71(4):505-8.

Bondareff W, Harrington C, Wischik CM, Hauser DL, Roth M (1994) Immunohistochemical staging of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:158–164.

Bondulich MK, Guo T, Meehan C, Manion J, Rodriguez Martin T, Mitchell JC, Hortobagyi T, Yankova N, Stygelbout V, Brion JP, Noble W, Hanger DP (2016) Tauopathy induced by low level expression of a human brain-derived tau fragment in mice is rescued by phenylbutyrate. *Brain.* 139(Pt 8):2290-306.

Boyne LJ, Tessler A, Murray M, Fischer I (1995) Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *J Comp Neurol* 358:279–293.

Braak H, Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82(4):239-59.

Braak H, Braak E (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging* 16:271–8–discussion278–84.

Braak, H., and Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging* 18, 351–357.

Braak H, Del Tredici K (2004) Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede insoluble amyloid-beta formation. *Neurobiology of Aging* 25:713–8–discussion743–6.

Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K (2011) Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:960– 969.

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

Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. (2016) Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond).* 16(3):247-53

Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J (1985) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol* 17:89–96.

Brown JL, Roberts WK (1976) Evidence that approximately eighty per cent of the soluble proteins from Ehrlich ascites cells are N-alpha-acetylated. *J Biol Chem.* 251(4):1009-14.

Brown JL (1979) A comparison of the turnover of alpha-N-acetylated and nonacetylated mouse L-cell proteins. *J Biol Chem.* 1979 Mar 10;254(5):1447-9.

Brummel MC, Sanborn BM, Stegink LD (1971) Chicken heart H 4 lactate dehydrogenase: N-terminal and C-terminal residues. *Arch Biochem Biophys.* 143(1):330-5

Buée L, Delacourte A (1999) Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease. *Brain Pathol.* 9(4):681-93.

Buée-Scherrer V, Hof PR, Buée L, Leveugle B, Vermersch P, Perl DP, Olanow CW, Delacourte A (1996) Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol* 91:351–359.

Bullmann, T., de Silva, R., Holzer, M., Mori, H., and Arendt, T. (2007) Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 17, 98–102.

Bullmann, T., Holzer, M., Mori, H., and Arendt, T. (2009). Pattern of tau isoforms expression during development in vivo. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 591–597.

Butler M, Shelanski ML (1986) Microheterogeneity of microtubule-associated tau proteins is due to differences in phosphorylation. *Journal of Neurochemistry* 47:1517–1522.

C

Caccamo A, Oddo S, Tran LX, LaFerla FM (2007) Lithium reduces tau phosphorylation but not A beta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *Am J Pathol* 170:1669–1675.

Caillet-Boudin, M.-L., Buée, L., Sergeant, N., and Lefebvre, B. (2015). Regulation of human MAPT gene expression. *Mol. Neurodegener.* 10, 28.

Caillierez R, Bégard S, Lécolle K, Deramecourt V, Zommer N, Dujardin S, Loyens A, Dufour N, Aurégan G, Winderickx J, Hantraye P, Déglon N, Buée L, Colin M. (2013) Lentiviral delivery of the human wild-type tau protein mediates a slow and progressive neurodegenerative tau pathology in the rat brain. *Mol Ther.* 21(7):1358-68.

Canu N, Dus L, Barbato C, Ciotti MT, Brancolini C, Rinaldi AM, Novak M, Cattaneo A, Bradbury A, Calissano P (1998) Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci* 18:7061–7074.

Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J (1996) The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 271(51):32789-95.

Cataldo AM, Nixon RA (1990) Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3861–3865.

Cataldo AM, Paskevich PA, Kominami E, Nixon RA (1991) Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10998–11002.

Chapuis , Hansmannel F, Gistelinc M, Mounier A, Van Cauwenberghe C, Kolen KV, Geller F, Sottejeau Y, Harold D, Dourlen P, Grenier-Boley B, Kamatani Y, Delepine B, Demiautte F, Zelenika D, Zommer N, Hamdane M, Bellenguez C, Dartigues JF, Hauw JJ, Letronne F, Ayril AM, Slegers K, Schellens A, Broeck LV, Engelborghs S, De Deyn PP, Vandenberghe R, O'Donovan M, Owen M, Epelbaum J, Mercken M, Karran E, Bantscheff M, Drewes G, Joberty G, Campion D, Octave JN, Berr C, Lathrop M, Callaerts P, Mann D, Williams J, Buée L, Dewachter I, Van Broeckhoven C, Amouyel P, Moechars D, Dermaut B, Lambert JC; GERAD consortium. (2013) Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry.* 18(11):1225-34.

Chartier-Harlin, M C, Crawford F, Houlden, A Warren, D Hughes, L Fidani, A Goate, M Rossor, P Roques, and J Hardy. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353(6347): 844–846.

Chasseigneaux S, Allinquant B (2012) Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *Journal of Neurochemistry* 120 Suppl 1:99–108.

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

Chiappetta G, NDiaye S, Demey E, Haddad I, Marino G, Amoresano A, Vinh J (2010) Dansylpeptides matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric (MALDI-MS) and tandem mass spectrometric (MS/MS) features improve the liquid chromatography/MALDI-MS/MS analysis of the proteome. 24:3021–3032.

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

Chung CW, Song YH, Kim IK, Yoon WJ, Ryu BR, Jo DG, Woo HN, Kwon YK, Kim HH, Gwag BJ, Mook-Jung IH, Jung YK (2001) Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol Dis* 8:162–172.

Cicognola C, Chiasserini D, Eusebi P, Andreasson U, Vanderstichele H, Zetterberg H, Parnetti L, Blennow K. (2016) No diurnal variation of classical and candidate biomarkers of Alzheimer's disease in CSF. *Mol Neurodegener.* 7;11(1):65.

Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11:909–913.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116:227–247.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977b) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116:207–225.

Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, Kwong LK, Mills IP, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2011a) The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun* 2:252.

Combs B, Hamel C, Kanaan NM (2016) Pathological conformations involving the amino terminus of tau occur early in Alzheimer's disease and are differentially detected by monoclonal antibodies. *Neurobiol Dis.* 94:18-31.

Combs B, Kanaan NM (2017) Exposure of the Amino Terminus of Tau Is a Pathological Event in Multiple Tauopathies. *Am J Pathol.* 187(6):1222-1229.

Condamines O, Buée-Scherrer V, Boissier L, Watzet A, Delacourte A, Pau B, Mourton-Gilles C (1995) New immunoassay for the mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease using two monoclonal antibodies against human paired helical filament tau proteins. *Neurosci Lett* 192:81–84.

Conde C, Cáceres A (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319–332.

Cook C, Carlomagno Y, Gendron TF, Dunmore J, Scheffel K, Stetler C, Davis M, Dickson D, Jarpe M, DeTure M, Petrucelli L (2014) Acetylation of the KXGS motifs in tau is a critical determinant in modulation of tau aggregation and clearance. *Hum Mol Genet* 23:104–116.

Coon KD, Myers AJ, Craig DW, Webster JA, Pearson JV, Lince DH, Zismann VL, Beach TG, Leung D, Bryden L, Halperin RF, Marlowe L, Kaleem M, Walker DG, Ravid R, Heward CB, Rogers J, Papassotiropoulos A, Reiman EM, Hardy J, Stephan DA (2007) A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*. 68:613–618.

Coria, F, I Rubio, and C Bayón. (1994) Alzheimer's disease, beta-amyloidosis, and aging. *Reviews in the neurosciences* 5(4): 275–292.

Corsetti V, Amadoro G, Gentile A, Capsoni S, Ciotti MT, Cencioni MT, Atlante A, Canu N, Rohn TT, Cattaneo A, Calissano P. (2008) Identification of a caspase-derived N-terminal tau fragment in cellular and animal Alzheimer's disease models. *Mol Cell Neurosci*. 38(3):381-92.

Coulton AT, East DA, Galinska-Rakoczy A, Lehman W, Mulvihill DP (2010) The recruitment of acetylated and unacetylated tropomyosin to distinct actin polymers permits the discrete regulation of specific myosins in fission yeast. *J Cell Sci*. 123(Pt 19):3235-43.

Courtois S, Verhaegh G, North S, Luciani MG, Lassus P, Hibner U, Oren M, Hainaut P. (2002) DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene*. 21:6722-8.

Cripps D, Thomas SN, Jeng Y, Davies P, Yang AJ (2006) Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. 281:10825–10838.

Cruz JC, Tseng H-C, Goldman JA, Shih H, Tsai L-H (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40:471–483.

D

Dai CL, Tung YC, Liu F, Gong CX, Iqbal K. (2017) Tau passive immunization inhibits not only tau but also A β pathology. *Alzheimers Res Ther*. 9(1):1.

David DC, Layfield R, Serpell L, Narain Y, Goedert M, Spillantini MG. (2002) Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem*. 83(1):176-85.

Dawson, H.N., Ferreira, A., Eyster, M. V, Ghoshal, N., Binder, L.I., and Vitek, M.P. (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.* 114, 1179–1187.

de Calignon A, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, Spires-Jones TL, Hyman BT (2010) Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464:1201–1204.

de Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL & Hyman BT (2012) Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 73: 685–697

Decker JM, Krüger L, Sydow A, Zhao S, Frotscher M, Mandelkow E, Mandelkow EM. (2015) Pro-aggregant Tau impairs mossy fiber plasticity due to structural changes and Ca(++) dysregulation. *Acta Neuropathol Commun.* 3:23.

Delacourte, A., and Defossez, A. (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76, 173–186.

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

Delacourte, A., David, J.P., Sergeant, N., Buée, L., Watzel, A., Vermersch, P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., et al. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52, 1158–1165.

Delobel P, Lavenir I, Fraser G, Ingram E, Holzer M, Ghetti B, Spillantini MG, Crowther RA, Goedert M (2008) Analysis of tau phosphorylation and truncation in a mouse model of human tauopathy. *Am J Pathol* 172:123–131.

Derisbourg M, Leghay C, Chiappetta G, Fernandez-Gomez FJ, Laurent C, Demeyer D, Carrier S, Buée-Scherrer V, Blum D, Vinh J, Sergeant N, Verdier Y, Buée L, Hamdane M(2015) Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci Rep.* 5:9659.

D'hondt C, Iyyathurai J, Vinken M, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B, Bultynck G. (2011) Regulation of connexin- and pannexin-based channels by post-translational modifications. *Biol Cell.* 105(9):373-98.

Dickson DW, Ksiazak-Reding H, Liu WK, Davies P, Crowe A, Yen SH (1992) Immunocytochemistry of neurofibrillary tangles with antibodies to subregions of tau

protein: identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site. *Acta Neuropathol* 84:596–605.

Dickson DW (2004) Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest* 114:23–27.

Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF (2008) Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319:1086–1089.

Dolan PJ, Johnson GV (2010) The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 13(5):595-603.

Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T (2016) The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta.* 1864(10):1372-401

Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3:1141–1154.

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

Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995) Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem* 270:7679–7688.

Drubin DG, Feinstein SC, Shooter EM, Kirschner MW (1985) Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol* 101:1799–1807.

Dujardin S, Lécolle K, Caillierez R, Bégard S, Zommer N, Lachaud C, Carrier S, Dufour N, Aurégan G, Winderickx J, Hantraye P, Déglon N, Colin M & Buée L (2014a) Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol Commun* 2: 14

Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, Loyens A, Galas M-C, Bousset L, Melki R, Aurégan G, Hantraye P, Brouillet E, Buée L & Colin M (2014b) Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS ONE* 9: e100760

Dumurgier J, Vercruyse O, Paquet C, Bombois S, Chaulet C, Laplanche JL, Peoc'h K, Schraen S, Pasquier F, Touchon J, Hugon J, Lehmann S, Gabelle A. (2013) Intersite variability of CSF Alzheimer's disease biomarkers in clinical setting. *Alzheimers Dement.* 9(4):406-13.

Duyckaerts C, Bennefib M, Grignon Y, Uchihara T, He Y, Piette F, Hauw JJ. (1997) Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiology of Aging* 18:267–273.

E

Engel T, Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernández F (2006) Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *Journal of Neurochemistry* 99:1445–1455.

F

Farrer, L A, L A Cupples, J L Haines, B Hyman, W A Kukull, R Mayeux, R H Myers, M A Pericak-Vance, N Risch, and C M van Duijn. (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A metaanalysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 278(16): 1349–1356.

Fasulo L, Ugolini G, Visentin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A (2000) The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 75:624–633.

Fasulo L, Ugolini G, Cattaneo A (2005) Apoptotic effect of caspase-3 cleaved tau in hippocampal neurons and its potentiation by tau FTDP-mutation N279K. *J Alzheimers Dis* 7:3–13.

Ferreira A, Bigio E (2011) Calpain-mediated tau cleavage: a mechanism leading to neurodegeneration shared by multiple tauopathies. *Molecular Medicine* 17:676–685.

Fischer D, Mukrasch MD, Biernat J, Bibow S, Blackledge M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009) Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry* 48:10047–10055.

Fisher TS, Etages SD, Hayes L, Crimin K, Li B (2005) Analysis of ARD1 function in hypoxia response using retroviral RNA interference. *J Biol Chem.* (18):17749-57.

Flament S, Delacourte A, Verny M, Hauw JJ, Javoy-Agid F (1991) Abnormal Tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol* 81:591–596.

Flores-Rodríguez P, Ontiveros-Torres MA, Cárdenas-Aguayo MC, Luna-Arias JP, Meraz-Ríos MA, Viramontes-Pintos A, Harrington CR, Wischik CM, Mena R, Florán-Garduño B, Luna-Muñoz J (2015) The relationship between truncation and phosphorylation at the C-terminus of tau protein in the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 9:33.

Fluge Ø, Bruland O, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR (2002) NATH, a novel gene overexpressed in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene.* 21(33):5056-68.

Forte GM, Pool MR, Stirling CJ (2011) N-terminal acetylation inhibits protein targeting to the endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* 9(5):e1001073.

Foyn H, Jones JE, Lewallen D, Narawane R, Varhaug JE, Thompson PR, Arnesen T (2013) Design, synthesis, and kinetic characterization of protein N-terminal acetyltransferase inhibitors. *ACS Chem Biol.* 8(6):1121-7.

Fratiglioni, L., De Ronchi, D., and Agüero-Torres, H. (1999). Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* 15, 365–375.

Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., and Hernández, F. (2012). Tau protein and adult hippocampal neurogenesis. *Front. Neurosci.* 6, 104.

G

Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, García-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL (2003) Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10032–10037.

García-Sierra F, Wischik CM, Harrington CR, Luna-Muñoz J, Mena R (2001) Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 22:65–77.

García-Sierra F, Ghoshal N, Quinn B, Berry RW, Binder LI (2003) Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 5:65–77.

- García-Sierra F, Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G (2008) Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 14(4):401-9.
- Garg S, Timm T, Mandelkow E-M, Mandelkow E, Wang Y (2011) Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment. *Neurobiology of Aging* 32:1–14.
- Garner CC, Matus A (1988) Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *J Cell Biol* 106(3):779-83.
- Gauthier-Kemper A, Weissmann C, Golovyashkina N, Sebö-Lemke Z, Drewes G, Gerke V, Heinisch JJ, Brandt R (2011) The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner. *J Cell Biol.* 192(4):647-61.
- Gautschi M, Just S, Mun A, Ross S, Rücknagel P, Dubaquié Y, Ehrenhofer-Murray A, Rospert S (2003) The yeast N(alpha)-acetyltransferase NatA is quantitatively anchored to the ribosome and interacts with nascent polypeptides. *Mol Cell Biol.* 2003 Oct;23(20):7403-14.
- Gelpi, E., Troakes, C., Arzberger, T., Leisser, I., Kretzschmar, H., Budka, H., Kovacs, G.G., Rozemuller, A.J.M., Swieten, J.C. Van, Gelpi, E., et al. (2013). Neuropathology of the hippocampus in FTLD-Tau with Pick bodies : a study of the BrainNet. 166-178.
- Ghetti B, Piccardo P, Spillantini MG, Ichimiya Y, Porro M, Perini F, Kitamoto T, Tateishi J, Seiler C, Frangione B, Bugiani O, Giaccone G, Prelli F, Goedert M, Dlouhy SR & Tagliavini F (1996) Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 744–748
- Ghoshal N, García-Sierra F, Wu J, Leurgans S, Bennett DA, Berry RW, Binder LI (2002) Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* 177:475–493.
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussière, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., and Hof, P.R. (2003) Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60, 1495–1500.
- Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* 2:357–369.

Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A (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. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4051–4055.

Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 8:393–399.

Goedert M, and Jakes R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225–4230.

Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8:159–168.

Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem J* 301 (Pt 3):871–877.

Goedert M, Jakes R (1995) Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1739(2-3):240-50.

Goetze S, Qeli E, Mosimann C, Staes A, Gerrits B, Roschitzki B, Mohanty S, Niederer EM, Laczko E, Timmerman E, Lange V, Hafen E, Aebersold R, Vandekerckhove J, Basler K, Ahrens CH, Gevaert K, Brunner E (2009) Identification and functional characterization of N-terminally acetylated proteins in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 7(11):e1000236.

Goldstein LS, Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23:39-71.

Gong, C.X., Singh, T.J., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 61, 921–927.

Gong, C.X., Shaikh, S., Wang, J.Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 65, 732–738.

Goode BL, Feinstein SC (1994) Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124:769–782.

Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L, Feinstein SC (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* 8:353–365.

Greenwood JA, Johnson GV. (1995) Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp Cell Res.* 220(2):332-7.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084–6089.

Grupe A, Abraham R, Li Y, Rowland C, Hollingworth P, Morgan A, Jehu L, Segurado R, Stone D, Schadt E, Karnoub M, Nowotny P, Tacey K, Catanese J, Sninsky J, Brayne C, Rubinsztein D, Gill M, Lawlor B, Lovestone S, Holmans P, O'Donovan M, Morris JC, Thal L, Goate A, Owen MJ, Williams J (2007) Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. *Hum Mol Genet.* 16:865–873.

Gu Y, Oyama F, Ihara Y (1996) Tau is widely expressed in rat tissues. *Journal of Neurochemistry* 67:1235–1244.

Guillozet-Bongaarts AL, García-Sierra F, Reynolds MR, Horowitz PM, Fu Y, Wang T, Cahill ME, Bigio EH, Berry RW, Binder LI (2005) Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 26:1015–1022.

Guillozet-Bongaarts AL, Cahill ME, Cryns VL, Reynolds MR, Berry RW, Binder LI (2006) Pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: in vitro evidence and implications for tangle formation in vivo. *J Neurochem.* 97(4):1005-14.

Guillozet-Bongaarts AL, Glajch KE, Libson EG, Cahill ME, Bigio E, Berry RW, Binder LI (2007) Phosphorylation and cleavage of tau in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol* 113:513–520.

Guo T, Noble W, Hanger DP (2017) Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* 133(5):665-704.

H

Haass C (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23:483–488.

Halpain S, Dehmelt L (2006) The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7(6) :224

Hanger, D.P., Betts, J.C., Loviny, T.L., Blackstock, W.P., and Anderton, B.H. (1998) New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Neurochem.* 71, 2465–2476.

Hanger DP, Wray S (2010) Tau cleavage and tau aggregation in neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans* 38:1016–1020.

Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.

Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41:1088–93.

Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem.* 267(24):17047-54.

Hayashi S, Toyoshima Y, Hasegawa M, Umeda Y, Wakabayashi K, Tokiguchi S, Iwatsubo T, Takahashi H (2002) Late-onset frontotemporal dementia with a novel exon 1 (Arg5His) tau gene mutation. *Ann Neurol.* 51(4):525-30.

Heim MH, Blum M, Beer M, Meyer UA (1991) Acetylation of serotonin in the rabbit pineal gland: an N-acetyltransferase with properties distinct from NAT1 and NAT2 is responsible. *J Neurochem.* 57(4):1095-9.

Helsens K, Van Damme P, Degroeve S, Martens L, Arnesen T, Vandekerckhove J, Gevaert K (2011) Bioinformatics analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* N-terminal proteome provides evidence of alternative translation initiation and post-translational N-terminal acetylation. *J Proteome Res.* 10(8):3578-89.

Héraud C, Goufak D, Ando K, Leroy K, Suain V, Yilmaz Z, De Decker R, Authélet M, Laporte V, Octave JN, Brion JP (2013) Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice. *Neurobiol Dis.* 262:100-12.

Hernández, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J., and Lucas, J.J. (2002) Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J. Neurochem.* 83, 1529–1533.

Hershko A, Heller H, Eytan E, Kaklij G, Rose IA (1984) Role of the alpha-amino group of protein in ubiquitin-mediated protein breakdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 7021-7025.

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

Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Harada R, Kanai Y. (1996) Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol.* 132(4):667-79.

Hoffmann R, Lee VM, Leight S, Varga I, Otvos L (1997) Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry* 36:8114–8124.

Hole K, Van Damme P, Dalva M, Aksnes H, Glomnes N, Varhaug JE, Lillehaug JR, Gevaert K, Arnesen T (2011) The human N-alpha-acetyltransferase 40 (hNaa40p/hNatD) is conserved from yeast and N-terminally acetylates histones H2A and H4. *PloS one* 6: e24713.

Holler CJ, Davis PR, Beckett TL, Platt TL, Webb RL, Head E, Murphy MP (2014) Bridging integrator 1 (BIN1) protein expression increases in the Alzheimer's disease brain and correlates with neurofibrillary tangle pathology. *J Alzheimers Dis.* 42(4):1221-7.

Holmes WM, Mannakee BK, Gutenkunst RN, Serio TR (2014) Loss of amino-terminal acetylation suppresses a prion phenotype by modulating global protein folding. *Nat Commun.* 5:4383.

Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., et al. (1998) Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914–1917.

Horiguchi T, Uryu K, Giasson BI, Ischiropoulos H, LightFoot R, Bellmann C, Richter-Landsberg C, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2003) Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am J Pathol* 163:1021–1031.

Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL, Reynolds MR, Carroll CA, Weintraub ST, Bennett DA, Cryns VL, Berry RW, Binder LI (2004) Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:7895–7902.

Hrnkova M, Zilka N, Minichova Z, Koson P, Novak M (2007) Neurodegeneration caused by expression of human truncated tau leads to progressive neurobehavioural impairment in transgenic rats. *Brain Res* 1130:206–213.

Hua, Q., and He, R. (2003). Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1645, 205–211.

Hunt, D.L., and Castillo, P.E. (2012). Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 496–508.

Hwang CS, Shemorry A, Varshavsky A (2010) N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science* 327: 973-977.

I

Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem* 99:1807–1810.

Irwin D, Cohen TJ, Grossman M, Arnold CS, Xie SX, Lee VMY, Trojanowski JQ (2012) Acetylated tau, a novel pathological signature in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Brain* 135:807–818.

Ishii K. (2014) PET approaches for diagnosis of dementia. *AJNR Am J Neuroradiol.* 35(11) :2030-8

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

Iyer A, Lapointe NE, Zielke K, Berdyski M, Guzman E, Barczak A, Chodakowska-Żebrowska M, Barcikowska M, Feinstein S, Zekanowski C (2013) A novel MAPT mutation, G55R, in a frontotemporal dementia patient leads to altered Tau function. *PLoS One.* 8(9):e76409

J

Jadhav S, Cubinkova V, Zimova I, Brezovakova V, Madari A, Cigankova V, Zilka N. (2015) Tau-mediated synaptic damage in Alzheimer's disease. *Transl Neurosci.* 6(1):214-226.

Jakes R, Novak M, Davison M, Wischik CM (1991) Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO J* 10:2725–2729.

Jeganathan, S., von Bergen, M., Bruchl, H., Steinhoff, H.-J., and Mandelkow, E. (2006). Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry* 45, 2283–2293.

Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 111(5):709-20.

Jho YS, Zhulina EB, Kim MW, Pincus PA (2010) Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation. *Biophys J* 99:2387–2397.

Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P (1997a) Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res* 48:128–132.

Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L, Hoffmann R, Davies P (1997b) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 69:2087–2095.

Johnson GV, Seubert P, Cox TM, Motter R, Brown JP, Galasko D (1997) The tau protein in human cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease consists of proteolytically derived fragments. *Journal of Neurochemistry* 68:430–433.

Jornvall H (1975) Acetylation of Protein N-terminal amino groups structural observations on alpha-amino acetylated proteins. *Journal of theoretical biology* 55: 1-12.

Jung D, Filliol D, Mische M, Rendon A (1993) Interaction of brain mitochondria with microtubules reconstituted from brain tubulin and MAP2 or TAU. *Cell Motil Cytoskeleton* 24:245–255.

K

Kadavath, H., Jaremko, M., Jaremko, Ł., Biernat, J., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015). Folding of the Tau Protein on Microtubules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 10347–10351.

Kahlson, M.A., and Colodner, K.J. (2015). Glial Tau Pathology in Tauopathies: Functional Consequences. *J. Exp. Neurosci.* 9, 43–50.

Kalvik TV, Arnesen T (2013) Protein N-terminal acetyltransferases in cancer. *Oncogene*. 32(3):269-76.

Kanaan NM, Morfini GA, LaPointe NE, Pigino GF, Patterson KR, Song Y, Andreadis A, Fu Y, Brady ST, Binder LI (2011) Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent

axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *J Neurosci.* 31(27):9858-68.

Kanaan NM, Morfini G, Pigino G, LaPointe NE, Andreadis A, Song Y, Leitman E, Binder LI, Brady ST (2012) Phosphorylation in the amino terminus of tau prevents inhibition of anterograde axonal transport. *Neurobiol Aging.* 33(4):826.e15-30.

Kanaan NM, Pigino G, Brady ST, Lazarof O, Binder LI, Morfini GA (2013) Axonal degeneration in Alzheimer's disease: when signaling abnormalities meet the axonal transport system. *Experimental Neurology* 246:44–53.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733–736.

Kanmert D, Cantlon A, Muratore CR, Jin M, O'Malley TT, Lee G, Young-Pearse TL, Selkoe DJ, Walsh DMv (2015) C-Terminally Truncated Forms of Tau, But Not Full-Length Tau or Its C-Terminal Fragments, Are Released from Neurons Independently of Cell Death. *J Neurosci.* 35(30):10851-65.

Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192–193.

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256(5517):495-7.

Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Rícný, J., Ripova, D., Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Rícný, J., Ripova, D., et al. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2012, 1–13.

Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993) Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 268:24374–24384.

Kosik KS, Duffy LK, Dowling MM, Abraham C, McCluskey A, Selkoe DJ (1984) Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:7941–7945.

Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron.* 2(4) :1389-97

Kovacech B, Novak M (2010) Tau truncation is a productive posttranslational modification of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 7:708–716.

Kovacs GG (2015) Invited review: Neuropathology of tauopathies: principles and practice. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41: 3–23.

Ksiezak-Reding H, Yen SH (1991) Structural stability of paired helical filaments requires microtubule-binding domains of tau: a model for self-association. *Neuron* 6:717–728.

Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res* 597:209–219.

Kuo ML, den Besten W, Bertwistle D, Roussel MF, Sherr CJ (2004) N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes & development* 18: 1862-1874.

L

Laakso MP, Soininen H, Partanen K, Lehtovirta M, Hallikainen M, Hänninen T, Helkala EL, Vainio P, Riekkinen PJ Sr. (1998) MRI of the hippocampus in Alzheimer's disease: sensitivity, specificity, and analysis of the incorrectly classified subjects. *Neurobiol Aging.* 19(1):23-31.

Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41:1094–9.

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

Lashley, T., Rohrer, J.D., Mead, S., et Revesz, T (2015) Review: An update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degenerations. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41, 858-881.

Ledesma MD, Bonay P, Colaço C, Avila J (1994) Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* 269:21614–21619.

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

Lee MJ, Lee JH, Rubinsztein DC. (2013) Tau degradation: the ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Prog Neurobiol.* 105:49-59.

Lemere CA, Masliah E. (2010) Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nat Rev Neurol.* 6(2):108-19.

Leroy K., Yilmaz, Z., and Brion, J.-P. (2007a) Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 43–55.

Leroy K., Bretteville A., Schindowski K., Gilissen E., Authelet M., De Decker R., Yilmaz Z., Buée L., Brion JP. (2007b) Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 171(3):976-92

Lewis SA, Wang DH, Cowan NJ (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 242(4880):936-9.

Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2008) Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67(1):78-84.

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

Liszczyk G, Goldberg JM, Foyn H, Petersson EJ, Arnesen T, Marmorstein R (2013) Molecular basis for N-terminal acetylation by the heterodimeric NatA complex. *Nat Struct Mol Biol.* 22(9):1098-105.

Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong C-X (2004) O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10804–10809.

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

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, e84849.

LLorens-Martin M, Jurado J, Hernández F, Avila J (2014) GSK-3β, a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci* 7:1–11.

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

LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.C., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10369–10373.

Loy CT, Schofield PR, Turner AM, Kwok JBJ (2014) Genetics of dementia. *Lancet* 383:828– 840.

Lu L, Berkey KA, Casero RA Jr (1996) RGFGIGS is an amino acid sequence required for acetyl coenzyme A binding and activity of human spermidine/spermine N1acetyltransferase. *J Biol Chem.* 271(31):18920-4.

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

M

Maas T, Eidenmüller J, Brandt R (2000) Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* 275:15733–15740.

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

Mallik R, Gross SP (2004) Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* 14(22):R971-82.

Mandelkow EM and Mandelkow E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary dégenération. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* 2(7) :a006247

Mann DM, Yates PO (1986) Neurotransmitter deficits in Alzheimer's disease and in other dementing disorders. *Hum. Neurobiol.* 5(3):147-58.

Martin DT, Gendron RL, Jarzembowski JA, Perry A, Collins MH, Pushpanathan C, Miskiewicz E, Castle VP, Paradis H (2007) Tubedown expression correlates with the differentiation status and aggressiveness of neuroblastic tumors. *Clin Cancer Res.* 13(5):1480-7.

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

Martín-Montañez E, López-Téllez JF, Acevedo MJ, Pavía J, Khan ZU. (2010) Efficiency of gene transfection reagents in NG108-15, SH-SY5Y and CHO-K1 cell lines. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 32(5):291-7.

Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* 4:2757–2763.

Matsumoto SE, Motoi Y, Ishiguro K, Tabira T, Kametani F, Hasegawa M, Hattori N (2015) The twenty-four kDa C-terminal tau fragment increases with aging in tauopathy mice: implications of prion-like properties. *Hum Mol Genet.* 24(22):6403-16.

McMillan PJ, Kraemer BC, Robinson L, Leverenz JB, Raskind M, Schellenberg G (2011) Truncation of tau at E391 promotes early pathologic changes in transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:1006–1019.

Melki R, Fievez S, Carlier MF. (1996) Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry.* 35(37):12038-45

Mendiola-Precoma J, Berumen LC, Padilla K, Garcia-Alcocer G. (2016) Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int.* 2016:2589276.

Mercken M, Vandermeeren M, Lübke U, Six J, Boons J, Van de Voorde A, Martin JJ, Gheuens J (1992) Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol* 84:265–272.

Midorikawa Y, Tsutsumi S, Taniguchi H, Ishii M, Kobune Y, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H (2002) Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis. *Jpn J Cancer Res.* 93(6):636-43.

Mietelska-Porowska A, Wasik U, Goras M, Filipek A, Niewiadomska G. (2014) Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction. *Int J Mol Sci.* 15(3):4671-713.

Migliaccio, R., Agosta, F., Possin, K.L., Canu, E., Filippi, M., Rabinovici, G.D., Rosen, H.J., Miller, B.L., and Gorno-Tempini, M.L. (2015). Mapping the Progression of Atrophy in Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers. Dis.* 46, 351–364.

Miller DK (1997) The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol.* 9(1):35-49. Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA (1993) Widespread

activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2628–2632.

Min S-W, Cho S-H, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y, Masliah E, Mukherjee C, Meyers D, Cole PA, Ott M, Gan L (2010) Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67:953–966.

Min SW, Chen X, Tracy TE, Li Y, Zhou Y, Wang C, Shirakawa K, Minami SS, Defensor E, Mok SA, Sohn PD, Schilling B, Cong X, Ellerby L, Gibson BW, Johnson J, Krogan N, Shamloo M, Gestwicki J, Masliah E, Verdin E, Gan L (2015) Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nat Med.* 21(10):1154-62.

Mistretta VI, Cavalier E, Collette J, Chapelle JP (2009) Production des anticorps monoclonaux. *Rev. Med. Liège.* 64 :5-6 :248-252

Mitchison, T., Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242.

Mohamed NV, Herrou T, Plouffe V, Piperno N, Leclerc N. (2013) Spreading of tau pathology in Alzheimer's disease by cell-to-cell transmission. *Eur J Neurosci.* 37(12):1939-48.

Monda JK, Scott DC, Miller DJ, Lydeard J, King D, Harper JW, Bennett EJ, Schulman BA (2013) Structural conservation of distinctive N-terminal acetylation-dependent interactions across a family of mammalian NEDD8 ligation enzymes. *Structure.* 21(1):42-53.

Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Santa-Maria I, Mena R, Binder LI, Avila J, Smith MA, Perry G, García-Sierra F (2008a) Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol.* 89(2):81-90.

Mondragón-Rodríguez S, Mena R, Binder LI, Smith MA, Perry G, García-Sierra F (2008b) Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:62–75.

Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., and Boehm, J. (2012). Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 287, 32040–32053.

Mori H, Kondo J, Ihara Y (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235:1641–1644.

Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1993) Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10:1151–1160.

Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K., and Ihara, Y. (1995). Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol. Aging* 16, 365-71-80.

Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L (2011) The many faces of tau. *Neuron* 70:410–426.

Mudher, A., Shepherd, D., Newman, T.A., Mildren, P., Jukes, J.P., Squire, A., Mears, A., Drummond, J.A., Berg, S., MacKay, D., et al. (2004) GSK-3 β inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol. Psychiatry* 9, 522–530.

Mukrasch MD, Biernat J, Bergen von M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2005). Sites of tau important for aggregation populate β -structure and bind to microtubules and polyanions. *J Biol Chem* 280:24978–24986.

Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jegannathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009) Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *Plos Biol.* 7(2):e34.

Mullen JR, Kayne PS, Moerschell RP, Tsunasawa S, Gribskov M, Colavito-Shepanski M, Grunstein M, Sherman F, Sternglanz R (1989) Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. *The EMBO journal* 8: 2067-2075.

Müller, R., Heinrich, M., Heck, S., Blohm, D., and Richter-Landsberg, C. (1997). Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res.* 288, 239–249.

Myklebust LM, Van Damme P, Støve SI, Dörfel MJ, Abboud A, Kalvik TV, Grauffel C, Jonckheere V, Wu Y, Swensen J, Kaasa H, Liszczak G, Marmorstein R, Reuter N, Lyon GJ, Gevaert K, Arnesen T (2014) Biochemical and cellular analysis of Ogden syndrome reveals downstream Nt-acetylation defects. *Hum Mol Genet.* 24(7):1956-76.

N

Narita K (1958) Isolation of acetylpeptide from enzymic digests of TMV-protein. *Biochim Biophys Acta.* 28(1):184-91.

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387:271–280.

Nieto A, Correas I, López-Otín C, Avila J. (1991) Tau-related protein present in paired helical filaments has a decreased tubulin binding capacity as compared with microtubule-associated protein tau. *Biochim Biophys Acta.* (3):197-204.

Norton, S., Matthews, F.E., Barnes, D.E., Yaffe, K., and Brayne, C. (2014) Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet. Neurol.* 13, 788–794.

Novak M, Wischik CM, Edwards P, Pannell R, Milstein C (1989) Characterisation of the first monoclonal antibody against the pronase resistant core of the Alzheimer PHF. *Prog Clin Biol Res.* 317:755-61.

Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM (1991) Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5837–5841.

Novak M, Kabat J, Wischik CM (1993) Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J* 12:365–370.

O

Ohkawa N, Sugisaki S, Tokunaga E, Fujitani K, Hayasaka T, Setou M, Inokuchi K (2008) N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells.* 13(11):1171-83.

Ohyama K, Yasuda K, Onga K, Kakizuka A, Mori N (2012) Spatio-temporal expression pattern of the NatB complex, Nat5/Mdm20 in the developing mouse brain: implications for co-operative versus non-co-operative actions of Mdm20 and Nat5. *Gene Expr Patterns.* 12(1-2):36-45.

Olesen OF (1994) Proteolytic degradation of microtubule associated protein tau by thrombin. *Biochem Biophys Res Commun.* 201(2):716-21.

Otvos L, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM (1994) Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 39:669–673.

Ozcelik S, Sprenger F, Skachokova Z, Fraser G, Abramowski D, Clavaguera F, Probst A, Frank S, Müller M, Staufenbiel M, Goedert M, Tolnay M, Winkler DT. (2016) Co-

expression of truncated and full-length tau induces severe neurotoxicity. *Mol Psychiatry*. 21(12):1790-1798.

P

Paholikova K, Salingova B, Opattova A, Skrabana R, Majerova P, Zilka N, Kovacech B, Zilkova M, Barath P, Novak M (2015) N-terminal truncation of microtubule associated protein tau dysregulates its cellular localization. *J Alzheimers Dis*. 2015;43(3):915-26.

Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Navarrete, M., Esteban, J.A., Hernández, F., Ávila, J., and Llorens-Martín, M. (2016). Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis. *EMBO J*. 35, 1417–1436.

Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L (2003) Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9548–9553.

Pandey. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Hybridoma* (2010) vol. 1 (2) pp. 017.

Panza F, Solfrizzi V, Seripa D, Imbimbo BP, Lozupone M, Santamato A, Tortelli R, Galizia I, Prete C, Daniele A, Pilotto A, Greco A, Logroscino G. (2016) Tau-based therapeutics for Alzheimer's disease: active and passive immunotherapy. *Immunotherapy*. 8(9):1119-34.

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

Piatti VC, Ewell LA, Leutgeb JK. (2013) Neurogenesis in the dentate gyrus: carrying the message or dictating the tone. *Front Neurosci*. 7:50.

Pick, A (1892) Ueber die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prager med Wschr* 17, 165–167.

Plouffe V, Mohamed N-V, Rivest-McGraw J, Bertrand J, Lauzon M & Leclerc N. (2012) Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PLoS ONE* 7: e36873

Polevoda B, Norbeck J, Takakura H, Blomberg A, Sherman F (1999) Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 18(21):6155-68.

Polevoda B, Sherman F (2001) NatC Nalpha-terminal acetyltransferase of yeast contains three subunits, Mak3p, Mak10p, and Mak31p. *J Biol Chem*. 276(23):20154-9.

Polevoda B, Sherman F (2003a) N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol.* 325(4):595-622.

Polevoda B, Cardillo TS, Doyle TC, Bedi GS, Sherman F (2003b) Nat3p and Mdm20p are required for function of yeast NatB Nalpha-terminal acetyltransferase and of actin and tropomyosin. *J Biol Chem.* 278(33):30686-97.

Polevoda B, Brown S, Cardillo TS, Rigby S, Sherman F (2008) Yeast N(alpha)-terminal acetyltransferases are associated with ribosomes. *J Cell Biochem.* 103(2):492-508.

Pooler AM, Phillips EC, Lau DHW, Noble W & Hanger DP. (2013) Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* 14: 389–394

Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M., and Schellenberg, G.D (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* 43, 815–825.

Poorkaj, P., Kas, A., D'Souza, I., Zhou, Y., Pham, Q., Stone, M., Olson, M. V, and Schellenberg, G.D. (2001). A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau. *Mamm. Genome* 12, 700–712.

Poorkaj P, Muma NA, Zhukareva V, Cochran EJ, Shannon KM, Hurtig H, Koller WC, Bird TD, Trojanowski JQ, Lee VM, Schellenberg GD (2002) An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. *Ann Neurol.* 52(4):511-6.

Porzig R, Singer D, Hoffmann R (2007) Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. *Biochem Biophys Res Commun* 358:644–649.

Prusiner SB. (1986) Prions are novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *Bioessays.* 5(6):281-6.

Prusiner SB (2013) Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu. Rev. Genet.* 47: 601–623

R

Raber, Jacob, Yadong Huang, and J Wesson Ashford. (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *NBA* 25(5): 641–650.

Ramcharitar J, Albrecht S, Afonso VM, Kaushal V, Bennett DA, LeBlanc AC (2013) Cerebrospinal fluid tau cleaved by caspase-6 reflects brain levels and cognition in aging and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:824–832.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev.* 61(9):746-59.

Rao MV, McBrayer MK, Campbell J, Kumar A, Hashim A, Sershen H, Stavrides PH, Ohno M, Hutton M, Nixon RA (2014) Specific calpain inhibition by calpastatin prevents tauopathy and neurodegeneration and restores normal lifespan in tau P301L mice. *Journal of Neuroscience* 34:9222–9234.

Raychaudhuri S, Majumder P, Sarkar S, Giri K, Mukhopadhyay D, Bhattacharyya NP (2008) Huntingtin interacting protein HYPK is intrinsically unstructured. *Proteins.* 71(4):1686-98.

Ree R, Myklebust LM, Thiel P, Foyn H, Fladmark KE, Arnesen T (2015) The N-terminal acetyltransferase Naa10 is essential for zebrafish development. *Biosci Rep.* 35(5).

Ren T, Jiang B, Jin G, Li J, Dong B, Zhang J, Meng L, Wu J, Shou C (2008) Generation of novel monoclonal antibodies and their application for detecting ARD1 expression in colorectal cancer. *Cancer Lett.* 264(1):83-92.

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

Reynolds MR, Lukas TJ, Berry RW, Binder LI (2006a) Peroxynitrite-mediated tau modifications stabilize preformed filaments and destabilize microtubules through distinct mechanisms. *Biochemistry* 45:4314–4326.

Reynolds MR, Reyes JF, Fu Y, Bigio EH, Guillozet-Bongaarts AL, Berry RW, Binder LI (2006b) Tau nitration occurs at tyrosine 29 in the fibrillar lesions of Alzheimer's disease and other tauopathies. *Journal of Neuroscience* 26:10636–10645.

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

Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, Laferla FM, Rohn TT, Cotman CW (2004) Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *Journal of Clinical Investigation* 114:121–130.

Rocchi L, Pacilli A, Sethi R, Penzo M, Schneider RJ, Treré D, Brigotti M, Montanaro L. (2013) Dyskerin depletion increases VEGF mRNA internal ribosome entry site-mediated 10 translation. *Nucleic Acids Res.* 41:8308-18.

Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW, Head E (2002) Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 11:341–354.

Rope AF, Wang K, Evjenth R, Xing J, Johnston JJ, Swensen JJ, Johnson WE, Moore B, Huff CD, Bird LM, Carey JC, Opitz JM, Stevens CA, Jiang T, Schank C, Fain HD, Robison R, Dalley B, Chin S, South ST, Pysher TJ, Jorde LB, Hakonarson H, Lillehaug JR, Biesecker LG, Yandell M, Arnesen T, Lyon GJ (2011) Using VAAST to identify an X-linked disorder resulting in lethality in male infants due to N-terminal acetyltransferase deficiency. *Am J Hum Genet.* 89(1):28-43.

S

Saha RN, Pahan K (2006) HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* 13(4):539-50.

Saunier C, Støve SI, Popp B, Gérard B, Blenski M, AhMew N, de Bie C, Goldenberg P, Isidor B, Keren B, Leheup B, Lampert L, Mignot C, Tezcan K, Mancini GM, Nava C, Wasserstein M, Bruel AL, Thevenon J, Masurel A, Duffourd Y, Kuentz P, Huet F, Rivière JB, van Slegtenhorst M, Faivre L, Piton A, Reis A, Arnesen T, Thauvin-Robinet C, Zweier C (2016) Expanding the Phenotype Associated with NAA10-Related N-Terminal Acetylation Deficiency. *Hum Mutat.* 37(8):755-64.

Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion JP, Hamdane M, Buée L (2006) Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol.* 169(2):599-616.

Schoenfeld TA, McKerracher L, Obar R, Vallee RB (1989) MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in CNS. *J Neurosci* 9(5) :1712-30

Schweers O, Schönbrunn-Hanebeck E, Marx A, Mandelkow E (1994) Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem.* 269(39):24290-7.

Scott DC, Monda JK, Bennett EJ, Harper JW, Schulman BA (2011) N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex, *Science.* 334 674-678.

Seitz A, Kojima H, Oiwa K, Mandelkow E-M, Song Y-H, Mandelkow E (2002) Singlemolecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *EMBO J* 21:4896–4905.

Seitz-Tutter D, Langford GM, Weiss DG (1988) Dynamic instability of native microtubules from squid axons is rare and independent of gliding and vesicle transport. *Exp Cell Res* 178:504–512.

Sengupta A, Kabat J, Novak M, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1998) Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys* 357:299–309.

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

Sergeant N, Delacourte A, Buée L (2005) Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:179–197.

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

Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270:18917–18922.

Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H, Rogaeva EA, Levesque G, Rogaev EI, Lin C, Liang Y, Ikeda M, Mar L, Brice A, Agid Y, Percy ME, Clerget-Darpoux F, Piacentini S, Marcon G, Nacmias B, Amaducci L, Frebourg T, Lannfelt L, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1996) Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Human molecular genetics*. 5(7):985–8.

Sigala, J., Jumeau, F., Caillet-Boudin, M.-L., Sergeant, N., Ballot, C., Rigot, J.-M., Marcelli, F., Tardivel, M., Buée, L., and Mitchell, V. Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis. *Asian J. Androl.* 16, 927–928.

Simón D, García-García E, Royo F, Falcón-Pérez JM & Avila J (2012) Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett.* 586: 47–54

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

Smith CJ, Anderton BH, Davis DR, Gallo JM (1995) Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. *FEBS Lett* 375(3) :243-8

Solomon H, Sharon M, Rotter V (2014) Modulation of alternative splicing contributes to cancer development: focusing on p53 isoforms, p53 β and p53 γ . *Cell Death Differ* 21:1347–1349.

Song OK, Wang X, Waterborg JH, Sternglanz R (2003) An Nalpha-acetyltransferase responsible for acetylation of the N-terminal residues of histones H4 and H2A. *J Biol Chem*. 278(40):38109-12.

Sönnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, Alleaume AM, Artelt J, Bettencourt P, Cassin E, Hewitson M, Holz C, Khan M, Lazik S, Martin C, Nitzsche B, Ruer M, Stamford J, Winzi M, Heinkel R, Röder M, Finell J, Häntsch H, Jones SJ, Jones M, Piano F, Gunsalus KC, Oegema K, Gönczy P, Coulson A, Hyman AA, Echeverri CJ (2005) Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 434(7032):462-9.

Soppa J (2010) Protein acetylation in archaea, bacteria, and eukaryotes. *Archaea*. pii: 820681. doi: 10.1155/2010/820681.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998a) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(11):6469-73.

Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998b) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7737–7741.

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

Spires-Jones TL, Hyman BT (2014) The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82:756–771.

Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M, Bruynseels K, Lasrado R, Vandezande K, Laenen I, Boon T, Van Lint J, Vandenheede J, Moechars D, Loos R, Van Leuven F (2000) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem* 275:41340–41349.

Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *The Journal of Cell Biology* 156:1051–1063.

Starheim KK, Arnesen T, Gromyko D, Rynningen A, Varhaug JE, Lillehaug JR (2008) Identification of the human N(alpha)-acetyltransferase complex B (hNatB): a complex important for cell-cycle progression. *Biochem J.* 415(2):325-31.

Starheim KK, Gevaert K, Arnesen T (2012) Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters. *Trends Biochem Sci.* 37(4):152-61.

Strous GJ, Berns AJ, Bloemendal H (1974) N-terminal acetylation of the nascent chains of alpha-crystallin. *Biochemical and biophysical research communications* 58: 876-884.

Sugiura N, Adams SM, Corriveau RA (2003) An evolutionarily conserved N-terminal acetyltransferase complex associated with neuronal development. *J Biol Chem.* 278(41):40113-20.

Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* 286, 4566–4575.

Szendrei, G.I., Lee, V.M., and Otvos, L. (1993) Recognition of the minimal epitope of monoclonal antibody Tau-1 depends upon the presence of a phosphate group but not its location. *J. Neurosci. Res.* 34, 243–249.

T

Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci.* 103 (Pt 4):953-64.

Tandon, A., Yu, H., Wang, L., Rogaeva, E., Sato, C., Chishti, M.A., Kawarai, T., Hasegawa, H., Chen, F., Davies, P., et al. (2003). Brain levels of CDK5 activator p25 are not increased in Alzheimer's or other neurodegenerative diseases with neurofibrillary tangles. *J. Neurochem.* 86, 572–581.

Tanzi RE. (2012) The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1;2(10)

Tardivel M, Bégard S, Bousset L, Dujardin S, Coens A, Melki R, Buée L, Colin M (2016) Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathol Commun.* 4;4(1):117.

Terry, R D. (2000). Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 59(12): 1118–1119.

Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800.

Tolnay, M., and Probst, A. (2003). The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies. *IUBMB Life* 55, 299–305.

Torres CR, Hart GW (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal Nacetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 259:3308–3317.

Tosto G, Reitz C. Genome-wide association studies in Alzheimer's disease: a review (2013) *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13(10):381

Trexler AJ, Rhoades E (2012) N-Terminal acetylation is critical for forming α -helical oligomer of α -synuclein. *Protein Sci.* 21(5):601-5.

Trzeciakiewicz H, Tseng JH, Wander CM, Madden V, Tripathy A, Yuan CX, Cohen TJ (2017) A Dual Pathogenic Mechanism Links Tau Acetylation to Sporadic Tauopathy. *Sci Rep.* 7:44102. doi: 10.1038

U

Ugolini G, Cattaneo A, Novak M (1997) Co-localization of truncated tau and DNA fragmentation in Alzheimer's disease neurones. *Neuroreport* 8:3709–3712.

V

Van Damme P, Evjenth R, Foyn H, Demeyer K, De Bock PJ, Lillehaug JR, Vandekerckhove J Arnesen T, Gevaert K (2011a) Proteome-derived peptide libraries allow detailed analysis of the substrate specificities of N(alpha)-acetyltransferases and point to hNaa10p as the post-translational actin N(alpha)-acetyltransferase. *Mol Cell Proteomics.* 10(5):M110.004580.

Van Damme P, Hole K, Pimenta-Marques A, Helsens K, Vandekerckhove J, Martinho RG, Gevaert K, Arnesen T (2011b) NatF contributes to an evolutionary shift in protein N-terminal acetylation and is important for normal chromosome segregation. *PLoS Genet.* 7(7):e1002169.

Van Damme P, Kalvik TV, Starheim KK, Jonckheere V, Myklebust LM, Menschaert G, Varhaug JE, Gevaert K, Arnesen T (2016) A Role for Human N-alpha Acetyltransferase 30 (Naa30) in Maintaining Mitochondrial Integrity. *Mol Cell Proteomics.* 15(11):3361-3372.

Van der Jeugd A, Ahmed T, Burnouf S, Belarbi K, Hamdame M, Grosjean ME, Humez S, Balschun D, Blum D, Buée L, D'Hooge R (2011) Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem.* 95(3):296-304.

Varshavsky A (2008) Discovery of cellular regulation by protein degradation. *The Journal of biological chemistry* 283: 34469-34489.

Varshavsky A (2011) The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci.* 2011 Aug;20(8):1298-345.

Verheecke P(1975) On the tau-protein in cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Sci.* 26(3):277-81.

Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nessler, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., et al. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 84.

W

Wang Y, Garg S, Mandelkow E-M, Mandelkow E (2010a) Proteolytic processing of tau. *Biochem Soc Trans* 38:955–961.

Wang Y, Mijares M, Gall MD, Turan T, Javier A, Bornemann DJ, Manage K, Warrior R (2010b) *Drosophila* variable nurse cells encodes arrest defective 1 (ARD1), the catalytic subunit of the major N-terminal acetyltransferase complex. *Dev Dyn.* 239(11):2813-27.

Wang Y, Mandelkow E. (2016) Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci.* 17(1):5-2

Wei, M.L., and Andreadis, A. (1998). Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.* 70, 1346–1356

Wei, Y., Qu, M.-H., Wang, X.-S., Chen, L., Wang, D.-L., Liu, Y., Hua, Q., and He, R.-Q. (2008). Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PLoS One* 3, e2600.

Weingarten, M., and gg, ff (1975) A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly.

Weingarten-Gabbay S, Khan D, Liberman N, Yoffe Y, Bialik S, Das S, Oren M, Kimchi A. (2013) The translation initiation factor DAP5 promotes IRES-driven translation of p53 mRNA. *Oncogene*. Jan 14

Williams DR (2006) Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Intern Med J*. 36: 652–660.

Williams DR, Holton JL, Strand C, Pittman A, de Silva R, Lees AJ & Revesz T (2007) Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy/parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain* .130: 1566–1576.

Wischik CM, Novak M (1988a) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. 85:4884–4888.

Wischik CM, Novak M, Thøgersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A (1988b) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4506–4510.

Witman GB, Cleveland DW, Weingarten MD, Kirschner MW (1976) Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:4070–4074.

Wloga D, Gaertig J (2011) Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci*. 123(Pt 20):3447-55.

Wray S, Saxton M, Anderton BH, Hanger DP. (2008) Direct analysis of tau from PSP brain identifies new phosphorylation sites and a major fragment of N-terminally cleaved tau containing four microtubule-binding repeats. *J Neurochem*. 105(6):2343-52.

Wszolek ZK, Tsuboi Y, Ghetti B, Pickering-Brown S, Baba Y, Cheshire WP (2005) Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Orphanet J Rare Dis*. 1:30.

Y

Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK. (1970). Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 66(4):1206-12.

Yamaguchi, H., Ishiguro, K., Uchida, T., Takashima, A., Lemere, C.A., and Imahori, K. (1996). Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol*. 92, 232–241.

Yamamoto, H., Hasegawa, M., Ono, T., Tashima, K., Ihara, Y., and Miyamoto, E. (1995) Dephosphorylation of fetal-tau and paired helical filaments-tau by protein phosphatases 1 and 2A and calcineurin. *J. Biochem.* 118, 1224–1231.

Yi CH, Sogah DK, Boyce M, Degterev A, Christofferson DE, Yuan J (2007) A genome-wide RNAi screen reveals multiple regulators of caspase activation. *J Cell Biol.* 179(4):619-26.

Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fähræus R. (2002) p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol.* Jun;4:462-7.

Yin H, Kuret J (2006) C-terminal truncation modulates both nucleation and extension phases of tau fibrillization. *FEBS Letters* 580:211–215.

Yoshizaki, C., Tsukane, M., and Yamauchi, T. (2004). Overexpression of tau leads to the stimulation of neurite outgrowth, the activation of caspase 3 activity, and accumulation and phosphorylation of tau in neuroblastoma cells on cAMP treatment. *Neurosci. Res.* 49, 363–371.

Yu C-H, Si T, Wu W-H, Hu J, Du J-T (2008) O-GlcNAcylation modulates the selfaggregation ability of the fourth microtubule-binding repeat of tau. *Biochem Biophys Res Commun* 375:59–62.

Yu M, Ma M, Huang C, Yang H, Lai J, Yan S, Li L, Xiang M, Tan D (2009) Correlation of expression of human arrest-defective-1 (hARD1) protein with breast cancer. *Cancer Invest.* 27(10):978-83.

Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, J DR, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, Vocadlo DJ (2008) A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol* 4:483–490.

Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, Vocadlo DJ (2012) Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat Chem Biol.*

Z

Zeng Y, Min L, Han Y, Meng L, Liu C, Xie Y, Dong B, Wang L, Jiang B, Xu H, Zhuang Q, Zhao C, Qu L, Shou C (2014) Inhibition of STAT5a by Naa10p contributes to decreased breast cancer metastasis. *Carcinogenesis.* 35(10):2244-53.

Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2005a) Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:227–231.

Zhang YJ, Xu YF, Chen XQ, Wang XC, Wang J-Z (2005b) Nitration and oligomerization of tau induced by peroxynitrite inhibit its microtubule-binding activity. *FEBS Letters* 579:2421–2427.

Zhang Q, Zhang X, Chen J, Miao Y, Sun A (2009a) Role of caspase-3 in tau truncation at D421 is restricted in transgenic mouse models for tauopathies. *J Neurochem.* 109(2):476-84.

Zhang Q, Zhang X, Sun A (2009b) Truncated tau at D421 is associated with neurodegeneration and tangle formation in the brain of Alzheimer transgenic models. *Acta Neuropathol.* 117(6):687-97.

Zhang Z, Song M, Liu X, Kang SS, Kwon I-S, Duong DM, Seyfried NT, Hu WT, Liu Z, Wang J-Z, Cheng L, Sun YE, Yu SP, Levey AI, Ye K (2014) Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Nat Med.*

Zhou L, McInnes J, Wierda K, Holt M, Herrmann AG, Jackson RJ, Wang YC, Swerts J, Beyens J, Miskiewicz K, Vilain S, Dewachter I, Moechars D, De Strooper B, Spires-Jones TL, De Wit J, Verstreken P. (2017) Tau association with synaptic vesicles causes presynaptic dysfunction. *Nat Commun.* 8:15295.

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

Zilka N, Kovacech B, Barath P, Kontsekova E, Novak M (2012) The self-perpetuating tau truncation circle. *Biochem Soc Trans* 40:681–686.