

Université Lille - Nord de France
Université du Droit et de la Santé de Lille II

École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THÈSE
Présentée par
DERISBOURG Maxime

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II
Spécialité: Neurosciences

**Identification et caractérisation fonctionnelle de nouveaux
sites de clivage de la protéine Tau**

Soutenue publiquement le 30 Mars 2015 devant le jury composé de:

M. le Dr Ronald MELKI	Rapporteur
M. le Dr Emmanuel PLANEL	Rapporteur
M. le Dr Yann VERDIER	Examineur
Mme le Dr. Isabelle ARNAL	Examinatrice
M. le Dr. Luc BUEE	Président du jury
Mme le Dr Malika HAMDANE	Directrice de Thèse

**A ma famille,
à mes proches,
à Margaux**

Remerciements

Pour débiter, je tiens à remercier les membres de mon jury, le **Dr Ronald Melki**, le **Dr Emmanuel Planel**, le **Dr Isabelle Arnal**, le **Dr Yann Verdier**, le **Dr Luc Buée** et le **Dr Malika Hamdane**, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'appartenir à ce jury de thèse et d'examiner ce travail. En particulier, je remercie le **Dr Ronald Melki** et le **Dr Emmanuel Planel** pour avoir accepté ce rôle de rapporteur de thèse, de lire avec minutie mon manuscrit et d'évaluer cette thèse.

Je remercie le **Pr Pierre Formstecher** pour avoir fait du centre de recherche Jean Pierre Aubert, mon terrain d'accueil pour ces années de Master et de Doctorat.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au **Dr Luc Buée** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche « Alzheimer & Tauopathies » pendant le Master et la thèse. Ces remerciements sont à l'image des kilos que j'ai pris à manger vos chocolats et compagnie pendant nos réunions et aux cheveux que j'ai perdus... Malgré vos responsabilités, scientifiques ou autres, qui ne s'amenuisent pas avec le temps, et votre grande renommée, vous m'avez toujours impressionné par votre accessibilité, votre sympathie et votre humilité. Je vous remercie également d'avoir suivi mes travaux au long de ces quatre années. Enfin, je garderai un souvenir inoubliable du chef d'équipe capable de vous envoyer des vanilles épicées au chorizo qui vous font monter l'aiguille du rire jusqu'à exploser la balance (cette phrase n'aura de sens que pour les gens qui ont vécu au sein de l'équipe Alzheimer & Tauopathies en pleine désinhibition du lobe frontal).

La suite de ces remerciements sont adressés à ma directrice de thèse : le **Dr Malika Hamdane**. Malika, je vais commencer par te remercier pour m'avoir fait confiance lors du M2 et de la thèse et ce, malgré le manque évident de style capillaire que tu m'as très souvent fait remarquer. Même si nous ne savions pas quelle tournure allait prendre ce projet (le saurons nous un jour ?), ton optimisme et ton calme m'ont toujours rassuré et guidé dans la bonne direction dans les moments de doute. Ta sympathie naturelle, ta disponibilité et ta tempérance ont été des qualités majeures au sein de notre relation professionnelle qui m'ont donné la confiance nécessaire pour mener ce projet. J'ai réellement pris plaisir à travailler avec toi. A travers nos nombreuses réunions, j'ai énormément appris sur le plan scientifique ; de par ta rigueur et tes réflexions constructives qui m'ont aidées au quotidien. Même s'il est souvent différent du mien, ton avis a toujours compté durant ces quatre années ; et j'espère trouver dans mon futur proche, quelqu'un qui saura me cerner aussi bien que toi pour me guider comme tu l'as fait. J'espère un jour arriver à inculquer autant de connaissances, avec autant de pédagogie, à quelqu'un de la même façon que tu l'as fait pour moi. Je te souhaite une bonne continuation au sein du laboratoire, et j'espère que nous garderons le contact pour d'éventuelles collaborations... qui sait ? Peut-être que je vais trouver des choses qui t'intéresseront chez le ver de terre ?

Je vais également remercier le **Dr Yann Verdier**, le **Dr Giovanni Chiappetta** et le **Dr Joëlle Vinh** pour notre collaboration. Je remercie particulièrement Yann et Giovanni pour nos échanges scientifiques et pour le temps passé à la paillasse, et le Dr Vinh pour ses remarques pertinentes lors de nos réunions. Je vais également remercier toute l'équipe du SMPB de l'ESPCI pour l'accueil chaleureux que vous m'avez témoigné lors de mes nombreuses venues.

Je tiens à remercier du fond du cœur, le **Dr David Blum** et le **Dr Nicolas Sergeant** pour avoir suivi ce travail de thèse. David, bosser avec toi, même si parfois c'est hard, a toujours été un vrai plaisir. Je ne te remercierai jamais assez pour m'avoir associé aux travaux de ta Blum team. Grâce à toi, j'ai pu apprendre qu'on peut être un très bon scientifique sans jamais porter de chemises... (et oui ; avec le nombre de vannes dont j'ai fait l'objet de ta part, il fallait bien t'attendre à une contrepartie). Nico, il n'y a aucun doute à avoir, tu gagnes la palme des blagues les plus pourries du labo (et il y a du niveau). Je te remercie pour t'être impliqué comme tu l'as fait dans ce projet ; tes idées et tes remarques ont toujours été les bienvenues et nous ont fait avancer. Sous vos hordes de vannes, se cachent des qualités humaines qui poussent les étudiants à vous écouter et à vous faire confiance. Je vous souhaite à tous les deux beaucoup de réussite dans vos futurs projets.

Merci également à l'ensemble des Docteurs de cette équipe : **Valérie Buée-Scherrer, Marie-Laure Caillet-Boudin, Morvane Colin, Vincent Deramecourt, Claire-Marie Dhaenens, Marie-Christine Galas, Sandrine Humez, Bruno Lefebvre** (allias tigrrou), **Bernard Sablonnière** et **Susanna Schraen** pour leur remarques pertinentes pendant les réunions d'équipe et pour leur soutien.

Je tiens également à remercier les personnes qui gèrent notre petit quotidien et qui nous simplifient la vie; je pense évidemment à toute l'équipe du secrétariat : **Céline Brand, Sophie Lesage, Nathalie Perrais, Michèle Revez** et **Staëlle Corvo-Chamaillard**. Votre sympathie et votre professionnalisme nous permettent de nous épanouir pleinement dans le cadre du JPArc. Je n'oublierai pas non plus notre duo, **Karim** et **Thomas** du service laverie, toujours de bonne humeur, et également **Renaud** pour les travaux quotidiens.

Je remercie également nos anciens, en commençant par **Francisco-José Fernandez-Gomez** (j'espère ne rien avoir oublié), notre cocotte nationale. Francisco, je vais commencer par te remercier pour ta serviabilité et ta gentillesse quotidienne. Travailler avec toi est un vrai plaisir, et j'espère que nos chemins dans le monde de la recherche se recroiseront. Tu resteras l'unique personne capable de peser 1mg au sein de notre unité ! Clairement, ta capacité à ingurgiter sans cesse bière, welsh, et autres saveurs typiquement 'chti m'impressionnera toujours ! Par contre, il est hors de question pour que nous partagions ton repas favori : chips et sucre. See u amigo. **Antoine**, à mon tour de te remercier. Antoine, nos manip High Fat/caféine resteront sans aucun doute l'expérience qui nous aura pris le plus de temps au labo. Optimiser chacune des conditions expérimentales pour mener à bien ce projet aura été un vrai challenge ! Je ne peux pas omettre tous nos fous rires avec cocotte, notamment ceux liés à ce célèbre congrès à Washington... **Cyril**, je ne savais pas dans quelle classe te répertorier, parmi les anciens ou les actuels ? Je te remercie pour tous nos échanges, surtout les échanges type LDP. Je te souhaite également beaucoup de réussite pour ta carrière, et qu'enfin, tu fasses partie de la classe des anciens...

Je tiens également à remercier ma collègue de grand banditisme : **Laëtitia** dit « maurice », et également ma future collaboratrice allemande **Sylvie** dit « nounourf... ». Les filles, vous étiez des piliers du labo à mon arrivée (private joke) ; et mon intégration au sein de votre équipe de demeures est passée par un bizutage de Karmeliet très sévère. Merci pour ces moments de bonheur !

Simon, ma moitié. La première chose qui me manquera, ca sera ce rire. Une sorte de mélange entre la loutre et la hyène saucée à la Dujardin. J'ai énormément apprécié tous nos débats (et non ébats comme certains peuvent s'imaginer...) qui se sont souvent terminés par : il faudra demander à Luc. J'espère que ton post-doc (chez Brad ?) ne fera que renforcer ta conviction

de devenir chercheur, car tes qualités scientifiques pour faire ce métier sont indéniables selon moi. Finalement, je suis sûr qu'un jour, nous publierons à deux ! Je garde un souvenir inoubliable de notre séjour (purement professionnel) aux USA, et j'espère que nous pourrions réitérer de nombreuses fois l'expérience de Coronado Island...

Je vais également remercier l'ensemble des ITA du labo, en commençant par la plus belle et la plus jeune de toutes : **Dominique**. Domi, merci beaucoup pour tout ton soutien technique pendant ces années de thèse. Tu restes toujours très coquette et très souriante ce qui fait que travailler avec toi est toujours un vrai plaisir ! **Raph** (notre khaleesi, tu feras des bisous à totor), **Séverine**, **Sabiha**, **Hélène O et Meliza** (avec ses nouvelles chaussures) ; vous êtes les anges gardiens du labo (je sens que je vais regretter ce compliment dès que j'aurais repris les manips). Merci de faire tous les efforts quotidiens que vous faites pour assurer un labo fonctionnel. Même si les étudiants passent leur temps à mettre la pagaille, le labo tourne ! Merci aussi pour votre gentillesse et votre serviabilité. Je vais ajouter un peu de testostérone dans ces remerciements, **Seb** (tu feras des bisous à Juju) et **Cédrick** (notre jeune marié !), merci pour votre sympathie et votre bonne humeur. Je vous souhaite à toutes et à tous beaucoup de réussite pour vos futurs projets personnels et professionnels.

Je tiens aussi à remercier les collègues du bureau, notamment **Claire**, encore une future maman... Merci beaucoup Claire pour toutes tes petites attentions quotidiennes, j'espère pour toi que ton prochain voisin de bureau sera moins chiant que l'ancien... Je vais également remercier les nouveaux membres de la Blum-team, **Vanessa** et **Elodie**, courage les filles ! Mes principales fans de blagues pas drôles ! Vous avez rendu l'atmosphère du bureau agréable et c'était cool de partager ces moments avec vous.

Merci aux nouveaux plus ou moins fraîchement arrivés ! **Coline**, je te passe le flambeau ! J'espère que tu auras autant de bons moments que moi j'en ai eu au sein de cette équipe ! Je te souhaite beaucoup de réussite dans la suite du projet (je te laisserai mon numéro au cas où tu aurais besoin de la dilution de Tau-5 :-)) **Alban** et **Anthony**, merci pour votre bonne humeur et votre sympathie naturelle, je pense que la relève Karmeliet-bistrot est assurée !

I will also thank our new Post-Docs, **Emilie**, **Roby** and **Davina**. I hope that you will be fine in the lab, and that you will have success in your work here. I wish you the best!

Enfin, je vais remercier l'ensemble des personnes de l'équipe et des personnes externes avec lesquelles nous travaillons quotidiennement, travaillant ici ou ailleurs... **Nadège** (notre ex-miss immuno...), le **Dr Valérie Vingtdeux** (je te souhaite beaucoup de réussite dans cette nouvelle aventure au sein du centre), son mari **Sébastien D**, **Meryem**, **Anne Sophie**, **Marie V**, **Céline**, **Fanny**, **Julien**, **Jérémy**, **Hélène T**, **Vincent H**, **Espérance**, **Amélie**, **Lucie**, **Katia**, **Sophie**, **Lucrezia** et **Andrea**.

Je tiens à terminer en remerciant les organismes financeurs de ma thèse : le CHRU de Lille et la région Nord Pas de Calais.

Résumé

Tau, pour *Tubulin Associated Unit*, est une protéine appartenant à la famille des protéines associées aux microtubules. La fonction la plus connue de cette protéine est celle de régulateur de la dynamique des microtubules, structure du cytosquelette assurant la morphologie, le fonctionnement et l'intégrité neuronale. A côté de son rôle physiologique au sein des cellules neuronales, Tau joue un rôle déterminant dans un groupe de pathologies neurodégénératives communément appelées Tauopathies dans lesquelles Tau est retrouvée sous forme agrégée et anormalement modifiée dans les neurones en dégénérescence. Dans la maladie d'Alzheimer (MA), la Tauopathie la plus fréquente, l'agrégation des protéines Tau anormalement modifiées constitue une lésion histologique : la dégénérescence neurofibrillaire (DNF). L'évolution spatiotemporelle de la DNF est étroitement corrélée aux signes cliniques. Actuellement, les mécanismes qui conduisent à cette agrégation des protéines Tau et à la DNF ne sont pas clairement établis.

Une dérégulation des modifications post-traductionnelles (MPT) de Tau est l'un des mécanismes proposés pour expliquer l'agrégation de la protéine Tau et de la formation des DNF. Parmi les MPT, la troncation de la protéine Tau jouerait un rôle central dans l'étiologie de la MA. Les analyses des tissus cérébraux de patients atteints de la MA montrent la présence de plusieurs fragments de troncation de Tau amino- et carboxy-terminaux. L'augmentation de la quantité de certaines de ces espèces tronquées de Tau, qui sont retrouvées dans les agrégats, est étroitement corrélée à la progression de la pathologie Tau et à la sévérité des symptômes. Néanmoins, à exception de quelques sites carboxy-terminaux de fragments identifiés, la nature exacte des nombreux fragments de troncation mis en évidence dans le tissu cérébral humain, de même que leur(s) rôle(s) dans le(s) processus pathologique(s) ne sont pas encore établis.

C'est dans ce contexte que se place ce travail de thèse dont le premier objectif a consisté à identifier de nouveaux sites de clivages amino-terminaux de la protéine Tau qui sont, de manière générale, moins caractérisés que les sites carboxy-terminaux. Pour cela, nous avons mis au point une approche protéomique en utilisant un modèle cellulaire, présentant des fragments de troncation de Tau, pour ensuite appliquer cette approche sur des tissus cérébraux provenant d'individus atteints de la maladie d'Alzheimer et d'individus sains. Grâce au développement de cette approche protéomique, nous avons précisément identifié le premier acide aminé de vingt-quatre sites de clivage de la protéine Tau. Comme les extrémités amino-terminales de ces fragments sont distribuées sur toute la séquence de Tau, chaque clivage pourrait entraîner des conséquences fonctionnelles différentes en fonction de la position du site. Nous avons donc débuté des analyses fonctionnelles dans des lignées cellulaires en caractérisant les propriétés de quatre fragments de Tau. Nos résultats montrent, de manière surprenante, que la perte d'une partie du domaine amino-terminal confère une capacité supérieure à lier et stabiliser les microtubules, en comparaison à la protéine Tau entière, suggérant que le domaine amino-terminal de Tau jouerait un rôle dans la régulation de la dynamique microtubulaire. Des études supplémentaires basées sur nos nouveaux fragments de troncation devraient améliorer nos connaissances sur l'impact de la troncation de Tau sur sa biologie et sur les processus pathologiques de la MA.

Abstract

Tau, for *Tubulin Associated Unit*, is a microtubule-associated protein. Tau is primarily involved in the regulation of microtubule stability and dynamics. Besides its physiological role in neurons, Tau is a central player in Alzheimer's disease (AD) and related Tauopathies, where it is found as aggregates in degenerating neurons. One of the neuropathological hallmarks of AD is the neurofibrillary degeneration (NFD), characterized by aggregated Tau proteins. Studies have shown that the progression of NFD in cortical brain areas is closely correlated to cognitive impairment in AD, supporting a central role for Tau in AD pathology. As of now, the mechanisms leading to NFD and its progression are far from being elucidated.

A deregulation of post-translational modifications (PTM) of Tau protein could be a mechanism that leads to Tau aggregation and NDF formation. Among PTM, Tau truncation could have an etiological role in Tau pathology. Indeed, the analysis of AD brains by western blotting and epitope mapping suggests the occurrence of cleavage sites in both the N-terminal and C-terminal parts of Tau proteins. While several N- and C-terminally truncated Tau species are observed in AD brains, only a limited number of specific Tau cleavage sites have been identified so far *in situ*. The species generated by these cleavages are found in neurofibrillary tangles, and their occurrence is correlated with the severity of the disease. However, the exact nature of the truncated fragments identified in the brain tissue, as well as their role in the pathological process are not yet established.

This work takes place in this context whose primary goal is to precisely identify new Tau cleavage sites, especially those at the N-terminus, which are less well characterized than those at the C-terminus. For this, we developed a proteomics approach by using a cellular model that displays Tau fragments and we applied this approach to identify N-terminally truncated Tau species in the human brain, from individuals with Alzheimer's disease and healthy individuals. Twenty-four amino-terminal cleavages sites have been identified with the development of this proteomic approach. As the amino-terminal ends of these fragments are distributed throughout the Tau sequence, each cleavage could lead to different functional consequences depending on the position of the site. Thus, we started functional studies by characterizing the properties of four fragments of Tau in cell lines. Our results interestingly show that loss of the Tau N-terminal domain allows a stronger ability to bind and stabilize microtubules, suggesting that the Tau N-terminal domain could play a direct role in the regulation of microtubule stabilization. Future studies based on our new N-terminally truncated-Tau species should improve our knowledge of the role of truncation in Tau biology as well as in the AD pathological process.

Avant propos

« Un problème créé ne peut être résolu qu'en réfléchissant à la façon dont il a été créé ». Albert Einstein (1879-1955).

Les protéines sont des macromolécules dont les fonctions au sein des cellules qui constituent un organisme varient de la structure cellulaire, à la signalisation cellulaire, en passant par le transport ou encore la motilité. Le terme « protéine » fût utilisé pour la première fois en 1838 par Jöns Jacob Berzelius, célèbre chimiste suédois. Deux hypothèses subsistent quant à l'origine de ce terme : la première explique que « protéine » vient du grec ancien « *prôtos* » qui signifie essentiel, premier ; cette première définition fait probablement référence au fait que ces macromolécules sont indispensables à la vie. La seconde propose que l'origine de ce terme fait mention au dieu grec Protée, qui pouvait changer de forme à volonté ; les protéines adoptent en effet de multiples conformations et présentent des fonctions très diverses.

De façon générale, les protéines sont régulées par des modifications chimiques qui peuvent conduire à l'addition d'un groupe fonctionnel ou d'une autre protéine, au changement de la nature d'un acide aminé ou à des changements structuraux. La troncation, du latin « *truncare* » est une des nombreuses modifications post-traductionnelles qui affectent ces protéines. Elle se définit par l'action de tronquer, d'amputer, conduisant ainsi à la génération de protéines tronquées. Les fragments de troncation ainsi générés présentent des propriétés et des fonctions différentes de celles de la protéine entière.

Ce travail de thèse s'intéresse particulièrement à la troncation d'une protéine neuronale, la protéine Tau, dont la fonction et les propriétés sont dérégulées dans la maladie neurodégénérative de ce siècle, la maladie d'Alzheimer. Les neurones des patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent une multitude de fragments de troncation de la protéine Tau dont l'identité et les conséquences fonctionnelles ne sont pas encore établies. Quelle est la nature des fragments de troncation de la protéine Tau ? Quelles sont leurs fonctions ? Telles sont les questions que ce travail de thèse aborde.

Sommaire

Liste des figures.....	6
Liste des tableaux.....	9
Liste des abréviations	10

Introduction.....	12
-------------------	----

Chapitre 1 : Biologie et physiopathologie de la protéine Tau13

I. Structure et fonctions..... 13

I.A Du gène MAPT aux protéines Tau en passant par l'épissage alternatif.....	13
I.B Structure de la protéine Tau	14
I.C Fonctions de la protéine Tau	17
I.C.1 Régulation de la dynamique des microtubule et conséquences cellulaires.....	17
I.C.1.a Dynamique microtubulaire.....	17
I.C.1.b Développement neuronal et croissance neuritique	19
I.C.1.c Transport axonal.....	20
I.C.2 Les autres fonctions de la protéine Tau.....	21
I.C.2.a Protection de l'ADN	21
I.C.2.b Transduction du signal.....	22
I.C.2.c Fonctions indéterminées.....	23

II. Tauopathies 24

II.A Le code barre des Tauopathies.....	25
II.B La maladie d'Alzheimer, une Tauopathie majeure	26
II.B.1 Généralités	26
II.B.2 Lésions neuropathologiques.....	27
II.B.2.a Aspects macroscopiques	27
II.B.2.b Aspects microscopiques	27
II.B.2.b.1 Les dépôts amyloïdes	28
II.B.2.b.2 Les dégénérescences neurofibrillaires.....	29
II.B.3 Interaction entre les deux lésions au niveau de la synapse	31

Chapitre 2 : Les modifications post-traductionnelles de Tau : régulatrices de sa biologie et de sa physiopathologie32

I. La phosphorylation 32

I.A Les kinases et les phosphatases de Tau	34
I.B La phosphorylation de Tau comme régulateur de sa biologie.....	35
I.C La dérégulation de la phosphorylation de Tau dans la MA.....	37

II. La Glycosylation 40

II.A La O-N-Acetylglucosaminylation (O-GlcNAc)	41
II.B La N-Glycosylation	41

III. La prolyl cis-trans isomérisation 42

IV. La glycation..... 44

V. La nitration.....	44
VI. La polyamination.....	45
VII. Acétylation et méthylation	46
VIII. Ubiquitinylation.....	47

Chapitre 3 : La troncation de la protéine Tau comme modification post-traductionnelle émergente.....50

I. La troncation de Tau dans la maladie d'Alzheimer et les Tauopathies. 50

I.A Les fragments de troncation de Tau identifiés dans la MA.....	50
I.A.1 Historique de la troncation de Tau et découverte d'un fragment au cœur des agrégats : le fragment Glu391	51
I.A.2 Le fragment de Tau se terminant par le résidu Asp421	53
I.A.3 Les autres fragments de Tau générés par des activités caspases.....	54
I.A.4 Les fragments indépendants de protéolyses enzymatiques.....	55
I.A.5 Le fragment se terminant par le résidu Asn358 : un site récemment découvert	56
I.B La troncation de Tau dans les Tauopathies	56
I.C Fragments de Tau dans le liquide cérébro-spinal.....	57

II. Les conséquences fonctionnelles de la troncation sur Tau..... 59

III. Les protagonistes de la troncation de Tau 63

III.A Généralités sur les protéases.....	63
III.B Les protéases impliquées dans la troncation de Tau.....	64
III.B.1 Tau substrat des caspases.....	64
III.B.2 Tau substrat des calpaïnes	65
III.B.3 Tau substrat des protéases lysosomiales.....	65
III.B.4 Autres protéases.....	66

IV. La troncation, un mécanisme commun dans l'étiologie des protéinopathies ? 66

IV.A Troncation de l' α -synucléine.....	67
IV.B Troncation des protéines impliquées dans les maladies par expansion de poly-glutamine	68
IV.C Troncation de TDP-43.....	70

Objectifs de la thèse73

Matériels et Méthodes.....76

Matériels77

I. Tissu cérébral humain..... 77

II. La lignée murine THY-Tau22 78

III. Lignées cellulaires 78

III.A SH-SY5Y	78
III.B N1E-115.....	79
III.C CHO	79

Méthodes80

I. Culture cellulaire..... 80

I.A Entretien des lignées cellulaires	80
I.B Transfection transitoire.....	80
I.C Traitements pharmacologiques.....	81
II. Construction des vecteurs d'expression.....	81
II.A Amorces	81
II.B Amplification par PCR des ADNc et préparation du vecteur pcDNA3.1.....	81
II.C Clonage dans le vecteur plasmidique pcDNA3.1	82
III. Analyses biochimiques	83
III.A Extractions protéiques	83
III.A.1 Extraction pour la caractérisation par WB	83
III.A.2 Extraction en vue d'IP (immunoprécipitation).....	84
III.A.3 Extraction en vue d'électrophorèse bidimensionnelle.....	84
III.B Electrophorèse monodimensionnelle	84
III.C Electrophorèse bidimensionnelle	85
III.D Western-Blot.....	85
III.E Coloration des protéines à l'argent en vue d'analyse en spectrométrie de masse	86
III.F Immunoprécipitation	87
III.G Fractionnement microtubulaire.....	88
III.H Fractionnement nucléaire	89
III.I Dosage d'activité HDAC	89
IV. Imagerie cellulaire par microscopie confocale.....	89
V. Analyses protéomiques	90
V.A Digestion en gel.....	90
V.B Marquage des fonctions amines primaires.....	90
V.C Analyses LC-MS/MS.....	91
V.D Interrogation des banques	92
V.E Analyses SRM pour « <i>selected monitoring reaction</i> »	92
VI. Analyses statistiques.....	92

Résultats.....94

Chapitre 1 : Identification de nouveaux sites de clivage de la protéine Tau par une approche protéomique95

I. Comment identifier des sites de clivage ?.....95

II. Identification de sites de clivage à partir de lignées cellulaires97

II.A Caractérisation de la troncation de Tau <i>in cellulo</i>	98
II.B Enrichissement de la protéine Tau et de ses fragments par IP	99
II.C Analyses LC-MS/MS	102
II.C.1 Les peptides tryptiques et Asp-N amino-dansylés et non amino- dansylés	104
II.C.2 Les peptides non-tryptiques et non-Asp-N amino-dansylés et non amino-dansylés.....	105
II.C.3 Les peptides présentant une modification amino-terminale autre que la dansylation.....	106

III. Identification de sites de clivage à partir de tissus cérébraux humains.....108

III.A Caractérisation de la troncation de Tau à partir de tissus cérébraux humains..	108
III.B Enrichissement de la protéine Tau et de ses fragments par IP.....	112

III.C Analyses LC-MS/MS.....	113
III.D Vers la validation des sites de clivage <i>in situ</i>	115
Chapitre 2 : Caractérisation de quatre fragments de troncation de Tau et effets sur la dynamique microtubulaire.....	118
I. Caractérisation des fragments Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau et Gly261-Tau	118
I.A Clonage et expression.....	118
I.B Caractérisation de la phosphorylation	120
II. Effet des fragments Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau et Gly261-Tau sur les microtubules	123
II.A Etude des niveaux d'acétylation de l' α -tubuline.....	124
II.B Expression et activité d'HDAC6, enzyme clé dans la désacétylation de l' α -tubuline.....	126
II.C Etude de la polymérisation microtubulaire <i>in cellulo</i>	127
II.D Etude de la distribution cytosolique et microtubulaire et effets sur la stabilité microtubulaire de la protéine Tau entière et de ses fragments	130
Discussion-Conclusion	134
I. Identification de nouveaux sites de clivage de la protéine Tau	136
I.A La nature des sites identifiés	136
I.A.1 Confrontation avec la littérature.....	135
I.A.2 Localisation des sites identifiés.....	136
I.A.3 N- α -acétylation des sites Ala2 et Gly134	137
I.A.4 Pyroglutamylation des sites Glu12, Gln33 et Gln124.....	138
I.B Pouvons nous exclure une troncation <i>in vitro</i> ?.....	139
I.C Quel est l'impact du délai post-mortem sur la troncation de Tau ?.....	141
I.D La troncation de Tau peut-elle se produire dans des conditions physiologiques ?	142
II. Implication du domaine amino-terminal de Tau dans la régulation de la dynamique microtubulaire.....	145
II.A Relation structure-fonction des fragments de Tau	145
II.B Les mécanismes potentiels qui sous-tendent le gain de fonction du fragments Gln124-Tau	147
II.C Quelles peuvent être les conséquences fonctionnelles liées à la stabilisation des microtubules ?	148
III. Perspectives.....	150
III.A Validation de la pertinence des sites de clivage identifiés chez l'Homme.....	150
III.B Identification de nouveaux fragments de Tau sein d'autres Tauopathies.....	151
III.C Approfondir la relation structure-fonction du fragment Gln124-Tau.....	152
III.D Etudier les conséquences cellulaires liées à la surexpression du fragment Gln124-Tau	152
Bibliographie	155
Annexes	191

I. Recouvrement de séquence de Tau après IP Tau-5 et coloration à l'argent	192
II. Listes des peptides obtenus à partir de tissus cérébraux humains.....	195
II.A Peptides non spécifiques	195
II.B Peptides Asp-N	196
II.C Peptides tryptiques	197
III. Formation artéfactuelle d'un résidu pyroglutamate.....	199
IV. Curriculum Vitae.....	200
V. Publication principale.....	204
VI. Publications supplémentaires	229

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du gène de Tau, de son transcrit primaire et des six isoformes protéiques dans le cerveau humain adulte.

Figure 2 : Représentation schématique de l'isoforme de Tau la plus longue (isoforme 2N4R).

Figure 3 : Organisation spatiale de Tau en solution.

Figure 4 : Représentation schématique de l'instabilité dynamique d'un microtubule.

Figure 5 : Représentation schématique de l'interaction de Tau avec un microtubule et du transport axonal au sein d'un neurone.

Figure 6 : Code barre et classification des Tauopathies.

Figure 7 : Aspects macroscopiques et microscopiques de la maladie d'Alzheimer.

Figure 8 : Observations et techniques de marquages des dépôts amyloïdes.

Figure 9 : Les deux voies de catabolismes de l'APP.

Figure 10 : Observations et techniques de marquages des dégénérescences neurofibrillaires.

Figure 11 : Evolution de la DNF selon Braak et Braak dans la MA.

Figure 12 : Régulation de la dynamique microtubulaire par l'état de phosphorylation de Tau.

Figure 13 : Le phosphorylome de Tau dans la maladie d'Alzheimer et les Tauopathies.

Figure 14 : Equilibre entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de Tau.

Figure 15 : Représentation schématique de l'isomérisation cis/trans des résidus pThr²³¹Pro²³² par Pin1 et conséquences associées.

Figure 16 : Réaction de nitration d'une tyrosine par l'ion peroxy-nitrique et caractéristiques des tyrosines de Tau soumises à cette MPT

Figure 17 : Réaction de polyamination par les transglutamilases.

Figure 18 : Réaction d'acétylation par les acétyltransférases.

Figure 19 : Représentation schématique de la dégradation de Tau par l'UPS.

Figure 20 : Représentation schématique et caractérisation ultrastructurale de PHFs natifs ou digérés par la pronase.

Figure 21 : Mécanisme de formation des résidus iso-aspartates proposés en 2004 par Watanabe et ses collaborateurs.

Figure 22 : Distribution des sites de clivage identifiés à partir de tissu cérébral humain de patients atteints de la MA ou d'autres Tauopathies.

Figure 23 : Modèle de démasquage des séquences pro-agrégatives de Tau par la troncation.

Figure 24 : Représentation schématique de l' α -synucléine, de ses sites de troncation et observation de corps de Lewy.

Figure 25 : Représentation schématique de l'huntingtine, de ses sites de clivage et observation immuno-histochimique d'une inclusion nucléaire d'huntingtine.

Figure 26 : Représentation schématique de la protéine TDP-43, de la distribution de ses sites de clivage et observation immuno-histochimique d'inclusions cytoplasmiques de TDP-43.

Figure 27 : Le cycle de la troncation dans les protéinopathies.

Figure 28 : Méthode de séparation chromatographique en gradient d'acétonitrile.

Figure 29 : Approche développée pour identifier les sites de clivage amino-terminaux de Tau.

Figure 30 : Figure représentative de la caractérisation par WB de la troncation de Tau dans les lignées cellulaires surexprimant Tau.

Figure 31 : Analyses par électrophorèse des immunoprécipitations Tau-Nter et Tau-5 à partir d'extraits de cellules Tau-WT.

Figure 32 : Caractérisation par WB et par LC-MS/MS après coloration à l'argent des produits d'IP de Tau surexprimée dans la lignée SH-SY5Y.

Figure 33 : Identification de cinq sites de clivages de Tau à partir d'extraits cellulaires de SH-SY5Y surexprimant Tau.

Figure 34 : Caractérisation par WB du profil de troncation de Tau au sein de cortex frontal humain d'individus présentant différents stades de Braak.

Figure 35 : Caractérisation par WB du profil de troncation de Tau au sein de cortex frontaux humains d'individus présentant différents stades de Braak.

Figure 36 : Analyse représentative par WB d'une immunoprécipitation Tau-5 à partir du cortex frontal d'un individu sain (BO) et d'un patient Alzheimer (BVI).

Figure 37 : Distribution des sites de clivages identifiés à partir du tissu cérébral humain.

Figure 38 : Séquences des peptides synthétiques utilisés pour les analyses SRM et abondance relative du peptide EDHAGTYLGLGDR au sein du tissu cérébral humain et de cellules surexprimant Tau.

Figure 39 : Nomenclature et représentation schématique des fragments clonés dans le vecteur d'expression pcDNA3.1.

Figure 40 : Analyse représentative de l'expression des fragments par WB en comparaison à la protéine Tau entière (FL-Tau).

Figure 41 : Caractérisation de la protéine Tau par électrophorèse bidimensionnelle.

Figure 42 : Caractérisation des fragments de troncation Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau, Gly261-Tau identifiés précédemment par LC-MS/MS par électrophorèse bidimensionnelle.

Figure 43 : Caractérisation de la phosphorylation des résidus Ser199, Thr231, Ser396, Ser262 et Ser356 des fragments de troncation et de la protéine Tau entière par WB.

Figure 44 : Effet de la surexpression des fragments de troncation de Tau sur les modifications post-traductionnelles de la tubuline.

Figure 45 : Effet de la surexpression des fragments de troncation de Tau sur l'expression et activité cytoplasmiques d'HDAC6.

Figure 46 : Distribution d'HDAC6 et d' α -TAT1 au sein de fractions enrichies en protéines microtubulaires ou cytosoliques.

Figure 47 : Effet de la surexpression de Tau sur la polymérisation microtubulaire *in cellulo*.

Figure 48 : Effet de la surexpression de la protéine Tau et de ses fragments sur la polymérisation microtubulaire *in cellulo*.

Figure 49 : Distribution microtubulaire et cytoplasmique de la protéine Tau et de ses fragments de troncation.

Figure 50 : Etude de la résistance à la dépolymérisation des microtubules *in cellulo*.

Figure 51 : Analyse du profil de troncation de la protéine Tau entière et de ses fragments en condition de lyse stringente par WB.

Figure 52 : Troncation de Tau dans le modèle THY-Tau22.

Figure 53 : Représentation schématique de l'isoforme 2N4R de Tau, de la position des acides aminés 218-258 et des sites de clivage Met11, Gln124, Val229 et Gly261.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Enumération des sites potentiels de phosphorylation en fonction des six isoformes de Tau.

Tableau 2 : Les trois classes de kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau *in vitro* ou *in vivo*.

Tableau 3 : Classification des quatre classes majeures de protéases.

Tableau 4 : Tableau présentant l'ensemble des tissus cérébraux humains utilisés pendant cette étude.

Tableau 5 : Tableau présentant l'ensemble des anticorps utilisés pendant cette étude.

Tableau 6: Peptides tryptiques amino-dansylés obtenus à partir des produits d'IP de cellules surexprimant la protéine Tau.

Tableau 7 : Peptides générés par l'Asp-N obtenus à partir des produits d'IP de cellules surexprimant la protéine Tau.

Tableau 8 : Ensemble de différentes formes d'un peptide généré par la digestion Asp-N présentant la même séquence amino-terminale qu'un peptide obtenu après digestion trypsine.

Tableau 9: Regroupement des peptides générés par l'Asp-N (en bleu) ou par la trypsine (en noir) obtenus à partir des produits d'IP de cellules surexprimant la protéine Tau et présentant des modifications post-traductionnelles amino-terminales.

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des échantillons cérébraux humains utilisés pour les analyses LC-MS/MS.

Tableau 11: Identification des sites de clivage à partir de tissus cérébraux humains.

Liste des abréviations

- $A\beta$: peptide β amyloïde
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AEP : Asparaginy endopeptidase
APP : *Amyloid Precursor Protein*
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomaux
ASC : Ataxies spino-cérébelleuses
ATP : Adénosine Tri Phosphate
DCB : Dégénérescence cortico-basale
DGA : Démences à Grains Argyrophiles
DNF : Dégénérescence neurofibrillaire
DFT : Démences Fronto-Temporales
DFTP-17 : Démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17
IP : Immunoprécipitation
LCS : Liquide cérebrospinal
LC-MS/MS : *Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*
MA : Maladie d'Alzheimer
MAP : *Microtubule Associated Protein*
MEP : Maladies par Expansions de Poly-glutamines
MPT : Modification post-traductionnelle
O-GlcNAc : O-N-acétylglucosaminylation
PDPK : *Proline Directed Protein Kinases*
PHF : *Paired Helical Filaments*
pI : Point isoélectrique
PPI : Peptidyl prolyl cis-trans isomérases
PSP : Paralyse Supranucléaire Progressive
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
SM : Spectrométrie de Masse
SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SRM : *Selected Reaction Monitoring*

TG : Transglutamylase

UTR : *Untranslated Region*

UPS : *Ubiquitin-Proteasom System*

WB : Western Blot

Introduction

Chapitre 1 : Biologie et physiopathologie de la protéine Tau

Tau, pour « *Tubulin Associated Unit* » a été découverte en 1975 comme facteur de polymérisation des microtubules (Weingarten et al., 1975). Tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules, ou encore MAP pour « *Microtubule Associated Protein* ». Cette protéine joue un rôle essentiel dans la régulation de la dynamique microtubulaire, du transport axonal et de la croissance neuritique pendant la différenciation neuronale. Chez l'Homme, Tau est majoritairement exprimée au sein des neurones. Elle apparaît comme une protéine multi facettes, principalement localisée dans le compartiment axonal, mais elle peut également se retrouver au niveau somato-dendritique ou encore dans le noyau (Morris et al., 2011). Ces localisations cellulaires lui permettent d'intervenir dans des voies de transduction de signal ou d'intervenir dans la protection de l'ADN en cas de stress.

I. Structure et fonctions

I.A Du gène MAPT aux protéines Tau en passant par l'épissage alternatif

Chez l'Homme, Tau est encodée par un gène unique localisé sur le chromosome 17, au locus 17q21, et s'étend sur une région de 140 kb (kilobases) (Neve et al., 1986). Ce gène est principalement exprimé dans les neurones et, de façon moins importante, dans certains tissus périphériques comme le cœur, les reins, les muscles, les poumons et les testicules (Gu et al., 1996).

Le transcrit primaire de Tau contient 16 exons numérotés de -1 à 14 (Andreadis et al., 1992). Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs et les exons 2, 3, 4A, 6, 8 et 10 sont alternatifs (Figure 1). L'épissage de ces derniers est régulé de façon développementale et tissus-spécifique (Goedert et al., 1989; Andreadis, 2005). Les exons -1 et 14 ne sont jamais traduits (région 5' UTR pour « *Untranslated Region* » et 3' UTR respectivement). Dans le système nerveux central (SNC), les exons 4A et 8 sont systématiquement exclus, alors que dans le système nerveux périphérique (SNP), l'exon 4A est inclus et donne naissance à l'isoforme de Tau la plus grande communément appelée « Big Tau » (Georgieff et al., 1993). L'exon 6 est exprimé de façon très minoritaire dans les ARNm de Tau dans le cervelet et conduit à l'expression d'une protéine Tau tronquée dans sa partie carboxy-terminale (Wei and Andreadis,

1998; Luo et al., 2004). Enfin, dans le SNC, l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 conduit à la production de **six isoformes protéiques**, appelés 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+), allant de 352 à 441 acides aminés (AA), l'inclusion de l'exon 3 étant dépendante de celle de l'exon 2 (Andreadis et al., 1992; Andreadis, 2005). De manière intéressante, les six isoformes sont exprimées chez l'adulte alors que seule l'isoforme fœtale (0N3R) est exprimée pendant le développement (Goedert et al., 1989).

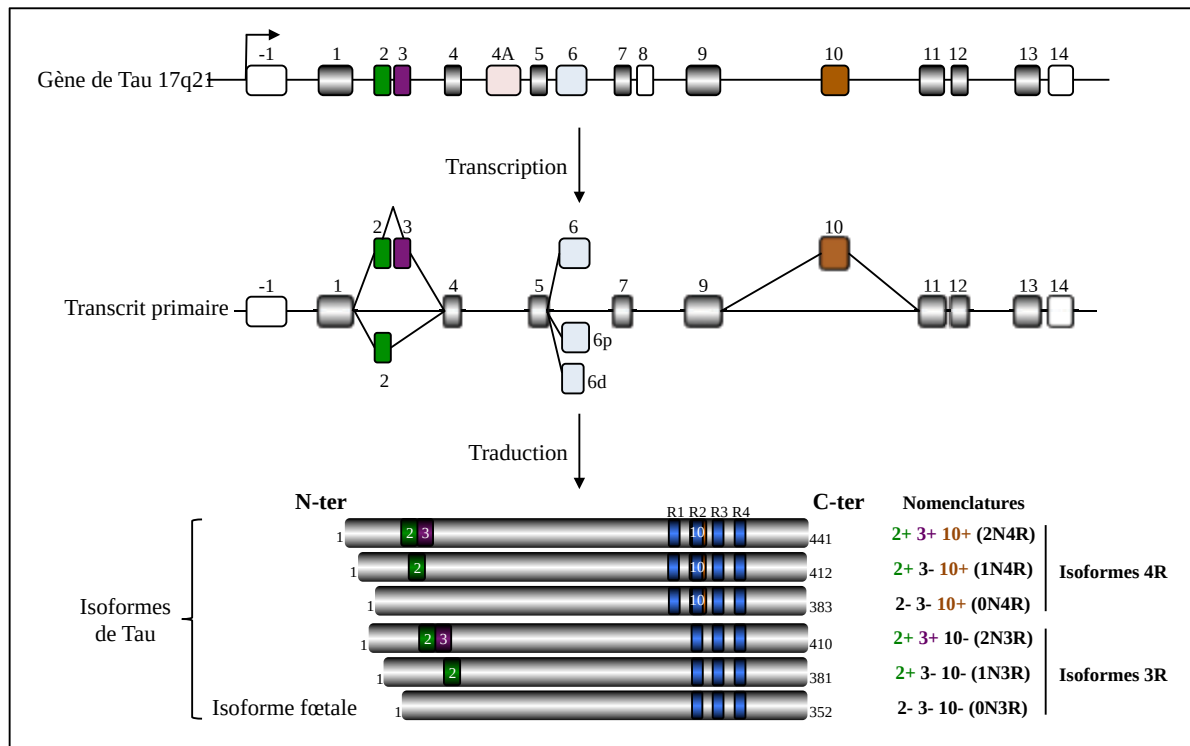


Figure 1 : Représentation schématique du gène de Tau, de son transcrit primaire et des six isoformes protéiques dans le cerveau humain adulte. Le gène humain codant pour la protéine Tau, localisé sur le chromosome 17 en position 17q21, contient 16 exons. Les exons -1 et 14 ne sont jamais traduits. L'exon 8 est systématiquement exclu, l'exon 4A n'est exprimé que dans le SNP donnant naissance à la « Big Tau ». Les exons 2, 3 et 10 sont également soumis à un épissage alternatif qui conduit à la génération de 6 isoformes protéiques chez l'adulte. L'inclusion ou non de l'exon 10 génère au niveau protéique 3 ou 4 motifs répétés (R1, R2, R3 et R4) donnant naissance aux isoformes de Tau dites 3R ou 4R. L'exclusion des exons 2, 3 et 10 conduit à la production de l'isoforme dite fœtale. Figure adaptée de (Buée et al., 2000).

I.B Structure de la protéine Tau

Au regard de sa composition en acides aminés, Tau peut être considérée comme un dipôle. De façon générale, deux domaines constituent Tau : un domaine amino-terminal appelé domaine de projection (encodé par les exons 1, 2, 3, 4, 5, 7) et un domaine carboxy-terminal de liaison aux microtubules (encodé par les exons 9, 10, 11, 12 et 13) (Figure 2).

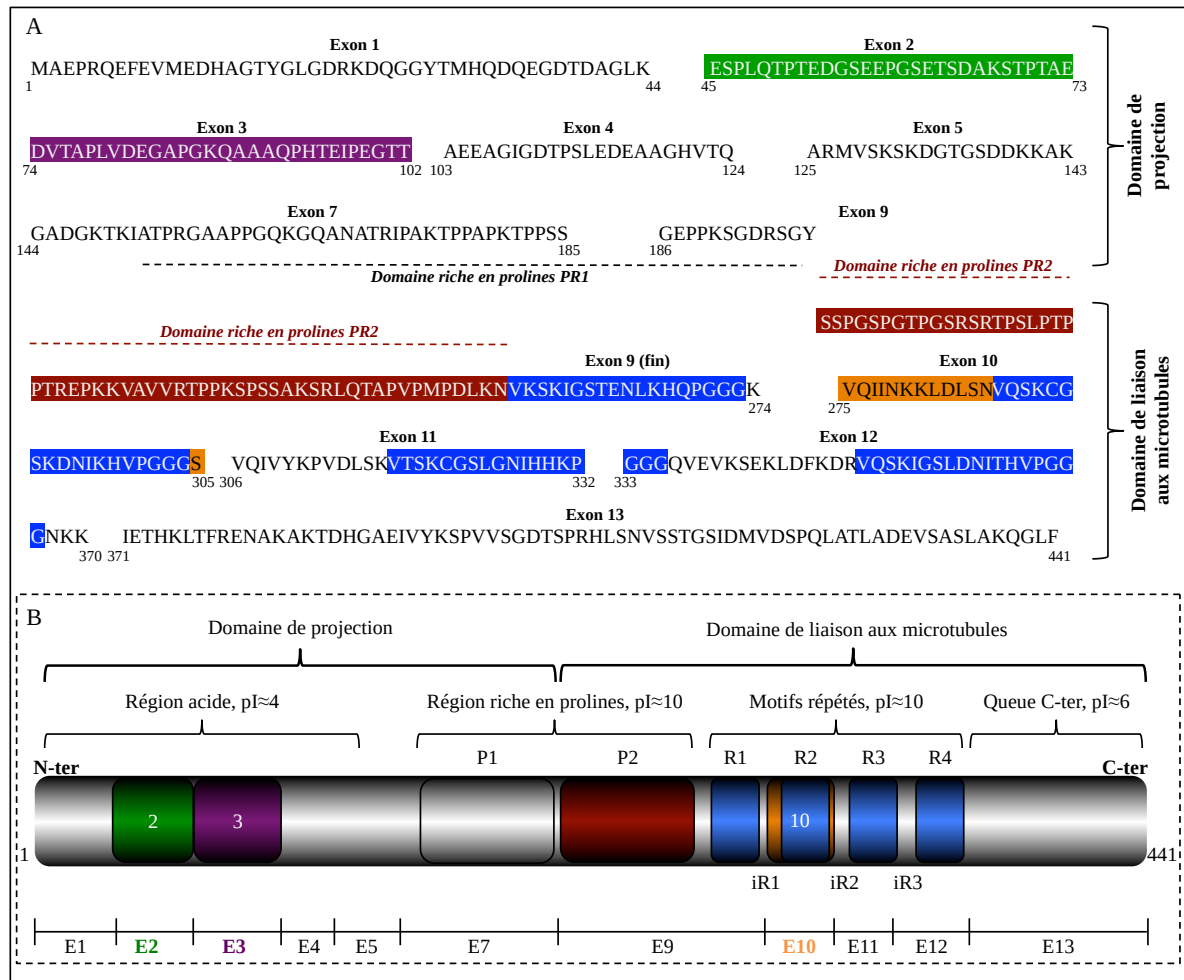


Figure 2 : Représentation de la structure primaire de l'isoforme de Tau la plus longue (isoforme 2N4R). (A) Structure primaire de Tau. Dans le SNC, l'isoforme de Tau la plus longue comprend les exons 2, 3 et 10 en plus des exons constitutifs et présente 441 acides aminés. (B) Le domaine de projection de Tau se compose d'une région amino-terminale acide et du domaine riche en prolines P1 plus basique. Le domaine de liaison aux microtubules est constitué du domaine riche en prolines P2 et des motifs répétés (3 ou 4 en fonction de l'inclusion ou non de l'exon 10), et d'une queue carboxy-terminale. Les motifs répétés sont séparés par les « inter-repeat » iR1, iR2 et iR3. E1 à E13 : exon 1 à exon 13.

Au niveau de la structure primaire de Tau, les acides aminés encodés par les exons 1 et 4 confèrent à Tau une partie amino-terminale acide. L'inclusion des exons 2 et 3 renforce ce caractère acide par une présence accrue d'acides glutamiques et aspartiques. Globalement, cette région présente un point isoélectrique (pI) de 3,99. L'exon 5 seul présente un pI de 9,82 et sert de lien entre la région amino-terminale acide et la région riche en prolines P1, elle aussi très basique, composée de l'exon 7. Ainsi, l'ensemble de ces régions constitue le domaine de projection. Ce terme « domaine de projection » est désigné de la sorte car il constituerait l'extrémité libre de Tau, non liée aux microtubules, servant à espacer ces derniers (Hirokawa et al., 1988).

L'exon 9 jusqu'à l'exon 12 codent pour la deuxième région riche en prolines P2 et pour trois ou quatre domaines répétés (en fonction de l'inclusion ou non de l'exon 10 qui code pour le second domaine répété R2) toujours à caractère basique (pI=10,11). Pour finir, l'exon 13 code pour une queue carboxy-terminale plutôt acide (pI=5,8). L'ensemble de ces régions constitue le domaine de liaison aux microtubules. Les motifs répétés R1, R2, R3 et R4 correspondent à des séquences hautement conservées dans la famille des MAP (Goedert et al., 1989) et sont directement impliqués dans l'interaction de Tau avec les microtubules. Les isoformes de Tau présentant trois motifs répétés sont appelées 3R à l'instar des isoformes 4R présentant les 4 motifs répétés.

De par sa composition en acides aminés, Tau présente un caractère très hydrophile assez inhabituel. Seulement cinq résidus constituent la moitié de sa séquence peptidique (glycine, lysine, proline, sérine, thréonine) (Mandelkow et al., 2007). Ainsi, Tau n'adopte pas une structure compacte comme la plupart des protéines cytosoliques. De manière générale, de nombreux travaux de résonance magnétique nucléaire (RMN), de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ou encore de dichroïsme circulaire révèlent que Tau se comporte globalement comme une protéine non conformée, intrinsèquement non ordonnée et qu'elle contient quelques structures secondaires transitoires (Cleveland et al., 1977a; Schweers et al., 1994; Mylonas et al., 2008; Mukrasch et al., 2009). De manière intéressante, les séquences peptidiques $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ et $^{306}\text{VQIVYK}^{312}$ localisées au sein des motifs répétés se prêtent à la formation de feuillets β (Mukrasch et al., 2005). Ce type de structure est une des caractéristiques communes des protéines à pouvoir fibrillogénique (Tyedmers et al., 2010). Le caractère désordonné de Tau se reflète notamment par le fait qu'en solution, elle occupe un volume vingt sept fois supérieur à une protéine de masse moléculaire identique et repliée. Ceci illustrerait que Tau peut former des interactions transitoires avec de nombreux partenaires protéiques. Malgré ce manque de structuration, il semblerait que Tau adopte préférentiellement une conformation globale en trombone dans laquelle le domaine carboxy-terminal recouvre le domaine amino-terminal (Jeganathan et al., 2006) ([Figure 3](#)).

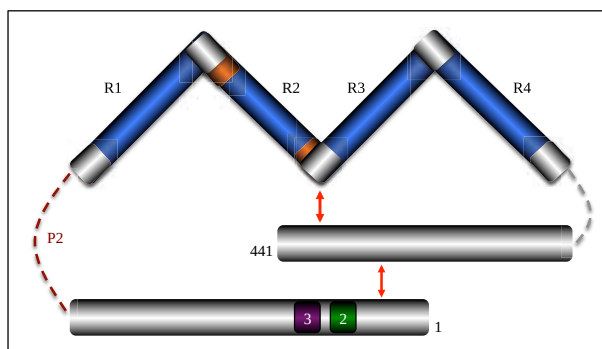


Figure 3. Organisation spatiale de Tau en solution. Des interactions intra-moléculaires de Tau (flèches rouges) lui confèrent une conformation dite en trombone dans laquelle le domaine carboxy-terminal recouvre le domaine amino-terminal. Figure adaptée du modèle de (Jeganathan *et al.*, 2006).

Les mécanismes de transcription du gène MAPT et de traduction des ARNm de Tau conduisent à la production de six isoformes protéiques, non structurés, chez le cerveau humain adulte. Quelles sont les particularités fonctionnelles de ces protéines Tau ?

I.C Fonctions de la protéine Tau

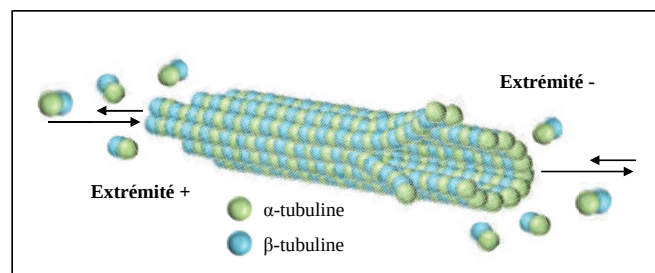
Initialement décrite comme facteur de polymérisation microtubulaire (Weingarten et al., 1975; Cleveland et al., 1977b), Tau joue un rôle majeur dans la régulation de la dynamique des microtubules au sein des neurones. Cette fonction de régulateur de la dynamique microtubulaire assure à Tau un rôle indirect dans la modulation du transport axonal ce qui permet d'assurer l'intégrité de la cellule neuronale et dans la différenciation neuronale en participant à la croissance neuritique. Bien qu'aujourd'hui cette fonction de régulateur de la dynamique microtubulaire demeure très étudiée, de nouvelles fonctions de Tau émergent dans la littérature.

I.C.1 Régulation de la dynamique des microtubules et conséquences cellulaires

I.C.1.a Dynamique microtubulaire

Les microtubules sont une structure protéique composée d'unités hétérodimériques de tubuline α et β capables de s'associer longitudinalement dans un premier temps formant ainsi les protofilaments. Ces derniers s'associent à leur tour de manière hélicoïdale pour former les microtubules. Ces structures cylindriques ont un diamètre de 25 nm déterminé par le nombre de protofilaments (13 généralement) et une longueur variable (Amos and Schlieper, 2005; Conde and Cáceres, 2009). Les microtubules sont sujets à une **instabilité dynamique** qui se définit par une élongation (également appelée phase de polymérisation) et un raccourcissement (phase de dépolymérisation) continuels (Figure 4).

Figure 4 : Représentation schématique de l'instabilité dynamique d'un microtubule. Les microtubules présentent une extrémité dite + dans laquelle l'incorporation des hétéro-dimères d' α et β -tubuline est favorisée et une extrémité dite – où les microtubules se désassemblent.



Ainsi, les microtubules sont polarisés de par la présence d'une extrémité dite + sur laquelle s'ajoutent des dimères de tubuline et d'une extrémité dite – où les dimères se désassemblent. De manière très intéressante, les microtubules sont plus stables au niveau neuronal en comparaison à d'autres types cellulaires grâce notamment à la présence des MAPs (Seitz-Tutter et al., 1988).

Tau partage, avec les autres membres de la famille des MAPs, la propriété de se lier aux microtubules. Cette interaction est possible via la présence des 3 ou 4 motifs répétés composés de 18 acides aminés (Himmler et al., 1989; Lee et al., 1989) hautement conservés et séparés par 13 ou 14 acides aminés moins conservés constitutifs des « inter-repeat » iR1, iR2 et iR3. Logiquement, la présence d'un quatrième motif répété dans les isoformes de Tau dites 4R augmente l'affinité de Tau pour les microtubules (Butner and Kirschner, 1991; Panda et al., 2003). Néanmoins, cette hausse d'affinité est dépendante de « l'inter-repeat » iR1 (présent uniquement dans les isoformes 4R) plus que du domaine répété (Goode and Feinstein, 1994). En outre des domaines répétés, la région riche en prolines P2 a également été montrée comme élément clé de la liaison de Tau aux microtubules (Goode et al., 1997). Le domaine de projection de Tau n'aurait aucune affinité pour la liaison de Tau sur les microtubules, mais il servirait d'espaceur entre ces derniers (Chen et al., 1992). Dans le même sens, l'exon 4A (exon traduit dans le SNP) servirait à espacer les microtubules dans certaines populations neuronales du SNP et à agrandir le diamètre des axones (Boyne et al., 1995).

Le mécanisme moléculaire de la liaison de Tau aux microtubules fait l'objet de nombreuses études et reste encore indéterminé. Cette difficulté à trouver un consensus de modélisation réside, entre autres, dans le manque de structuration de Tau qu'elle soit seule en solution ou complexée aux microtubules. Néanmoins, des travaux plus récents utilisant la RMN proposent un modèle dit en « mâchoire » dans lequel les domaines répétés structurés en feuillets- β ainsi que le domaine riche en prolines P2 interagissent avec les régions riches en acides glutamiques de la tubuline (Mukrasch et al., 2007; Sillen et al., 2007). Ces motifs répétés présentant globalement un caractère basique et l'extrémité carboxy-terminale de la tubuline un caractère acide, cette interaction serait ionique (Jho et al., 2010). Récemment, il a été montré qu'au niveau des microtubules, Tau s'organise en « *hot-spot* » très localisés avec une molécule de Tau pour soixante dimères de tubuline (Breuzard et al., 2013).

De nombreuses études *in vitro* et *in cellulo* ont étayé les conséquences moléculaires et cellulaires de la liaison de Tau aux microtubules. Les premiers travaux *in vitro* utilisant des extraits de cerveaux porcins ont mis en évidence que Tau était co-purifiée avec la tubuline

(Weingarten et al., 1975; Cleveland et al., 1977b) et que la présence de Tau permettait à la tubuline de s'assembler en complexe de masse moléculaire plus importante. Les études mécanistiques démontrèrent que Tau module différents aspects de la dynamique microtubulaire. En effet, Tau agit comme un facteur servant à la fois à accroître la vitesse d'assemblage des microtubules et à augmenter la quantité de microtubules polymérisés (Witman et al., 1976). La longueur moyenne d'élongation d'un microtubule isolé polymérisé en présence de Tau est neuf fois supérieure à la longueur d'élongation d'un microtubule polymérisé en absence de Tau (Drechsel et al., 1992). Ceci s'explique par la combinaison de différents éléments : l'augmentation de l'élongation, la diminution du raccourcissement mais également la baisse de la fréquence de raccourcissement. Les travaux fonctionnels dans les modèles cellulaires et murins ont permis de définitivement valider le rôle de Tau dans la dynamique microtubulaire. Pour preuve, une micro-injection de protéine Tau purifiée dans des cultures de fibroblastes permet d'augmenter la densité microtubulaire et de protéger les microtubules d'une dépolymérisation induite pharmacologiquement (Drubin and Kirschner, 1986). De plus, la surexpression de Tau conduit à la formation de faisceaux microtubulaires (Kanai et al., 1989) suggérant la formation de ponts physiologiques entre les microtubules afin de renforcer le réseau.

Les microtubules sont une structure dynamique du cytosquelette impliqués, entre autres, dans la régulation du transport axonal. Ils interviennent également dans le processus de formation de l'axone et des neurites pendant la différenciation neuronale. En régulant la dynamique microtubulaire, Tau participe activement aux conséquences cellulaires qui en découlent.

I.C.1.b Développement neuronal et croissance neuritique

Les neurones sont des cellules polarisées présentant un corps cellulaire (soma) et deux types de prolongements : les dendrites qui reçoivent l'information des neurones efférents et l'axone qui conduit l'information nerveuse jusqu'aux connexions terminales qui transmettent l'information aux neurones afférents voisins ([Figure 5A](#)). L'établissement de la polarisation neuronale est un processus complexe qui constitue une étape fondamentale dans le développement du système nerveux. La constitution de l'axone est l'un des mécanismes primordiaux dans cette polarisation neuronale et sa mise en place est en partie dépendante de la dynamique microtubulaire. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à l'implication de

Tau dans ce processus.

Dans un modèle de lignée cellulaire PC12 (phéochromocytome de rat) différenciée en cellules de type neuronal, une corrélation a été établie entre l'accroissement des neurites, l'augmentation de microtubules polymérisés et l'expression de Tau (Drubin et al., 1985). L'implication de Tau dans le processus de formation de l'axone et de la différenciation neuronale fut validée en utilisant des sondes oligonucléotidiques antisens pour inhiber l'expression de Tau dans des cultures primaires de cervelet (Caceres and Kosik, 1990; Caceres et al., 1991). De la même façon, les neurones de culture primaire de souris invalidées génétiquement pour Tau présentent des prolongements neuritiques plus petits que leurs homologues sauvages (Dawson et al., 2001). Indépendamment de son implication dans la dynamique microtubulaire, Tau régulerait également le développement axonal directement en interagissant avec la membrane plasmique via son domaine de projection (Brandt et al., 1995).

I.C.1.c Transport axonal

Les pôles somato-dendritiques étant séparés par les synapses de l'axone, les microtubules axonaux assurent un transport axonal bidirectionnel des vésicules, des neurotransmetteurs et des mitochondries. Ainsi, le transport axonal représente un processus cellulaire vital pour maintenir l'intégrité des connexions et des fonctions synaptiques et neuronales. Pour cela, les microtubules vont servir de support aux MAPs motrices telles que la dynéine et la kinésine qui modulent respectivement le transport rétrograde (des synapses vers le soma) et antérograde (du soma vers les synapses) (Kanaan et al., 2013) (Figure 5B).

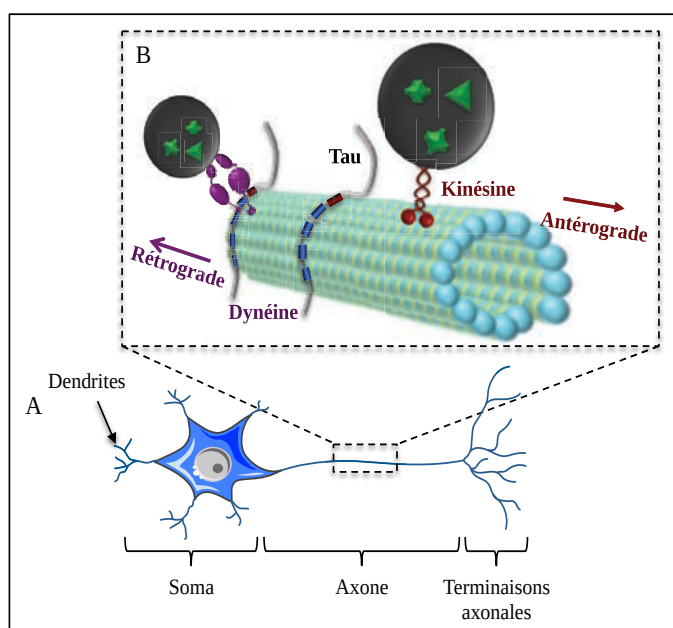


Figure 5 : Représentation schématique de l'interaction de Tau avec un microtubule et du transport axonal au sein d'un neurone. (A) Les neurones sont des cellules polarisées présentant un pôle somato-dendritique, un axone et les terminaisons axonales. (B) La protéine Tau est capable de se lier aux microtubules via ses motifs répétés (en bleu) et son second domaine riche en prolines P2 (en rouge). Cette interaction module le transport axonal antérograde et rétrograde des protéines motrices kinésine et dynéine respectivement.

Il existe un équilibre entre les différentes MAPs nécessaire au bon fonctionnement du transport axonal. Une rupture de cet équilibre par une surexpression de Tau dans des lignées cellulaires ou des cultures primaires conduit à une accumulation des peroxysomes et des mitochondries au sein du corps cellulaire suggérant soit une diminution du transport antérograde, soit une augmentation du transport rétrograde (Stamer et al., 2002). Des travaux parallèles indiquèrent qu'une forte concentration en Tau empêcherait la kinésine de se lier aux microtubules mais qu'une fois la liaison établie, aucune modification de la vitesse de ce moteur protéique n'était mesurée (Seitz et al., 2002). Néanmoins, une série d'études plus récentes, utilisant un système *in vitro* de billes couplées à la kinésine, prouvent clairement que la liaison de Tau aux microtubules diminue le déplacement de la kinésine sur les microtubules (Vershinin et al., 2007; Tarhan et al., 2013). De manière intéressante, l'inclusion du deuxième motif de liaison aux microtubules exacerbe la diminution de la vitesse de la kinésine. L'isoforme fœtale ne semble pas être capable de moduler ce transport axonal puisque l'incubation à forte concentration de cette isoforme sur des neurones isolés de calamar ne perturbe pas les mouvements de la kinésine (Morfini et al., 2007). En outre, Tau modulerait également le transport rétrograde via la dynéine non pas en modulant sa liaison ou sa vitesse de déplacement, mais en inversant sa direction (Dixit et al., 2008). L'ensemble de ces résultats a été étayé par des études *in vivo* dans lesquelles la surexpression de Tau dans le SNC conduit à des troubles de transport axonal (Ishihara et al., 1999; Zhang et al., 2005a).

De par sa fonction de MAP, Tau est indirectement capable de réguler la transport axonal et développement neuronale en favorisant la croissance neuritique. De plus, en interagissant avec des partenaires comme la kinésine ou la dynactine, Tau peu directement moduler le transport axonal. Ces fonctions de Tau sont principalement liées à la présence des motifs répétés à l'origine de son appartenance à la famille des MAPs. Néanmoins, d'autres études suggèrent que Tau serait bien plus que MAP puisque Tau peut être localisée au sein du noyau et au niveau synaptique. Ces nouvelles localisation cellulaires de Tau s'accompagnent de nouvelles fonctions.

I.C.2 Les autres fonctions de Tau

I.C.2.a Protection de l'ADN

A côté de sa localisation cytosolique, Tau est également retrouvée au sein du noyau de

cellules neuronales (Loomis et al., 1990) et non neuronales (Sjöberg et al., 2006) ce qui suggère que Tau pourrait développer d'autres fonctions au sein de la cellule. En effet, des études *in cellulo* ont démontré que Tau est présente au sein du nucléole - un sous compartiment nucléaire siège de la synthèse des acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr) - et plus particulièrement, au niveau de l'hétérochromatine constitutive (Sjöberg et al., 2006). Ces résultats suggèrent que Tau jouerait un rôle dans l'organisation nucléolaire et/ou dans l'hétérochromatinisation des gènes codants pour les ARNr. Par ailleurs, des études *in vitro* basées sur un retard électrophorétique sur gel d'agarose ont montré que Tau était capable de directement se lier à l'ADN (Qu et al., 2004) et que cette interaction était réversible en cas de présence des histones (Hua et al., 2003). Les motifs répétés et les domaines riches en prolines seraient tous les deux impliqués dans cette interaction (Wei et al., 2008).

Plus récemment, des travaux dans un modèle murin de culture primaire de neurones, indiquèrent que Tau, en condition de stress thermique ou oxydant, est capable de migrer vers le noyau et de se lier à l'ADN. Cette délocalisation nucléaire de Tau protégerait l'ADN de lésions induites par le stress (Sultan et al., 2011). Ces résultats ont par ailleurs été validés dans des modèles murins puisqu'un stress thermique induit dans des souris KO Tau augmente les dommages à l'ADN en comparaison à des souris sauvages (Violet et al., 2014). Ces travaux ouvrent donc de nouvelles perspectives de recherche quant aux fonctions physiologiques de Tau au sein du neurone.

I.C.2.b Transduction du signal

De par la présence des domaines riches en prolines, Tau est capable d'interagir avec certaines protéines à domaine SH3 via ses motifs PXXP (sept séquences localisées dans les domaines riches en prolines) notamment les protéines de la famille Src au niveau de la membrane plasmique (Lee et al., 1998). Ainsi, Tau s'associe avec des protéines kinases telles que Fyn, Src (Lee et al., 1998; Reynolds et al., 2008) qui sont impliquées, entre autres, dans la phosphorylation du récepteur NMDA, récepteur post-synaptique essentiel à la signalisation moléculaire de la mémoire et de la plasticité synaptique neuronale (Blum and Konnerth, 2005). Une interaction de Tau avec de telles protéines suggère que cette dernière jouerait donc un rôle dans la voie de transduction du signal. Une étude plus récente confirme ces données et élargit même la liste des partenaires de Tau présentant un domaine SH3. De ce fait, Tau est également connue pour interagir avec Grb2, PLC γ (phospholipase C γ), PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Reynolds et al., 2008) suggérant le rôle étendu du domaine riche en prolines de Tau dans

différentes voies de signalisation cellulaire. Bien que les significations biologiques de ces interactions ne soient pas encore déterminées, certains travaux proposent des perspectives intéressantes. Il a par exemple été montré que Tau servirait de véritable médiateur entre Fyn et le récepteur NMDA au niveau de la synapse puisqu'en absence de Tau, Fyn ne transite plus vers la synapse pour assurer sa fonction (Ittner et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2012).

I.C.2.c Fonctions indéterminées

Il a été montré dans des systèmes acellulaires que Tau et une autre protéine de la famille des MAPs, MAP2, étaient co-purifiées avec les mitochondries et que cette interaction serait dépendante du domaine de liaison aux microtubules (Jancsik et al., 1989; Jung et al., 1993). Tau est retrouvée également dans des fractions membranaires enrichies en appareil de Golgi provenant de cerveaux de rats (Farah et al., 2006). Enfin, Tau peut être retrouvée au sein de vésicules de sécrétion (Pooler et al., 2013; Dujardin et al., 2014a). La signification biologique de ces interactions ou localisations n'est pas encore connue aujourd'hui.

De par sa composition en acides aminés, Tau est un dipôle avec deux domaines définis, le domaine de projection et domaine de liaison aux microtubules. Ce dernier confère à Tau des fonctions de régulateur de la dynamique microtubulaire et du transport axonal tous deux importants pour le développement neuronal et le fonctionnement du neurone. Néanmoins, l'étude du domaine de projection a permis d'enrichir les études fonctionnelles de Tau comme intermédiaire dans différentes voies de signalisation (Morris et al., 2011). Ainsi, Tau est une protéine à plusieurs facettes, capable de se localiser à différents endroits de la cellule (microtubules, cytoplasme, noyau, membrane plasmique) ou d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire, et d'avoir une multitude de fonctions. Les mécanismes qui sous-tendent ces localisations subcellulaires différentielles ne sont pas totalement élucidés : existe-t-il un pool de protéine Tau cytoplasmique qui peut être adressé ponctuellement dans différents compartiments cellulaires selon les besoins de la cellule ou bien s'agit-il de différents pools de Tau présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes qui leur confèrent ces localisations différentielles ?

Toutes ces fonctions sont finement régulées par un certain nombre de modifications post-traductionnelles qui seront développées dans le chapitre suivant. La perte de fonctions de la protéine Tau, et/ou un gain de fonction toxique, ou encore une dérégulation de l'épissage de

Tau, contribuent aux processus physiopathologiques d'un groupe de maladies neurodégénératives communément appelées Tauopathies.

II. Tauopathies

En 1994, une forme héréditaire de démence fronto-temporale avec syndrome parkinsonien a été découverte comme étant liée au chromosome 17 dans une région contenant le gène codant pour la protéine Tau, le gène MAPT (Wilhelmsen et al., 1994). De nouvelles formes de démences fronto-temporales ont été trouvées plus tardivement liées à la même région ce qui a conduit à l'appellation générale des démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (DFTP-17) (Foster et al., 1997). Dans ces pathologies, de nombreux patients présentaient des agrégats de protéines Tau intra-neuronaux ou intra-gliaux.

1998, une année phare pour les Tauoïstes car elle est associée à la découverte de **mutations dans le gène MAPT chez des patients atteints de DFTP-17** (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Aujourd'hui, plus d'une cinquantaine de mutations introniques ou exoniques ont été décrites sur ce gène et elles sont systématiquement associées au développement de la pathologie. Il faut noter que ces mutations sont très souvent localisées dans les régions codantes pour les domaines de liaison aux microtubules. Selon la mutation, différentes conséquences fonctionnelles sont observées. Ainsi, des mutations vont conduire à des modifications de l'épissage au niveau des exons alternatifs, entraînant de ce fait, un déséquilibre des isoformes 3R et 4R ; à des pertes de fonctions physiologiques en défavorisant l'interaction de Tau avec les microtubules ou encore à un gain de fonction pathologique en favorisant l'agrégation de Tau (Dickson et al., 2011; Spillantini and Goedert, 2013). Pour terminer, ces mutations dans le gène de Tau illustrent le fait que Tau peut jouer un rôle majeur dans les maladies neurodégénératives et elles sont l'un des moyens les plus utilisés aujourd'hui pour modéliser la pathologie Tau.

Outre son implication dans les DFTP-17, Tau joue un rôle majeur dans un groupe de pathologies neurodégénératives communément appelées Tauopathies parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer (MA) est la plus représentée. **L'agrégation des protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées** au sein de la lésion histologique caractéristique de chacune de ces pathologies est à l'origine de leur regroupement dénommatif. Ces agrégats de protéines Tau prendront différentes formes en fonction de la Tauopathie. Ainsi, les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) sont observées dans la MA, les corps de Pick dans la maladie de Pick ou encore des touffes gliales dans la paralysie supranucléaire progressive (PSP). L'évolution de

la protéomique et des outils biochimiques a permis d'établir une véritable classification de ce groupe de maladies neurodégénératives (Buee et al., 2000; Sergeant et al., 2005; 2008).

II.A Le code barre des Tauopathies

Quatre classes de Tauopathies sont définies, celles-ci sont basées sur la composition en protéines Tau retrouvées au sein des agrégats extraits à partir des cerveaux de patients (Figure 6A et 6B).

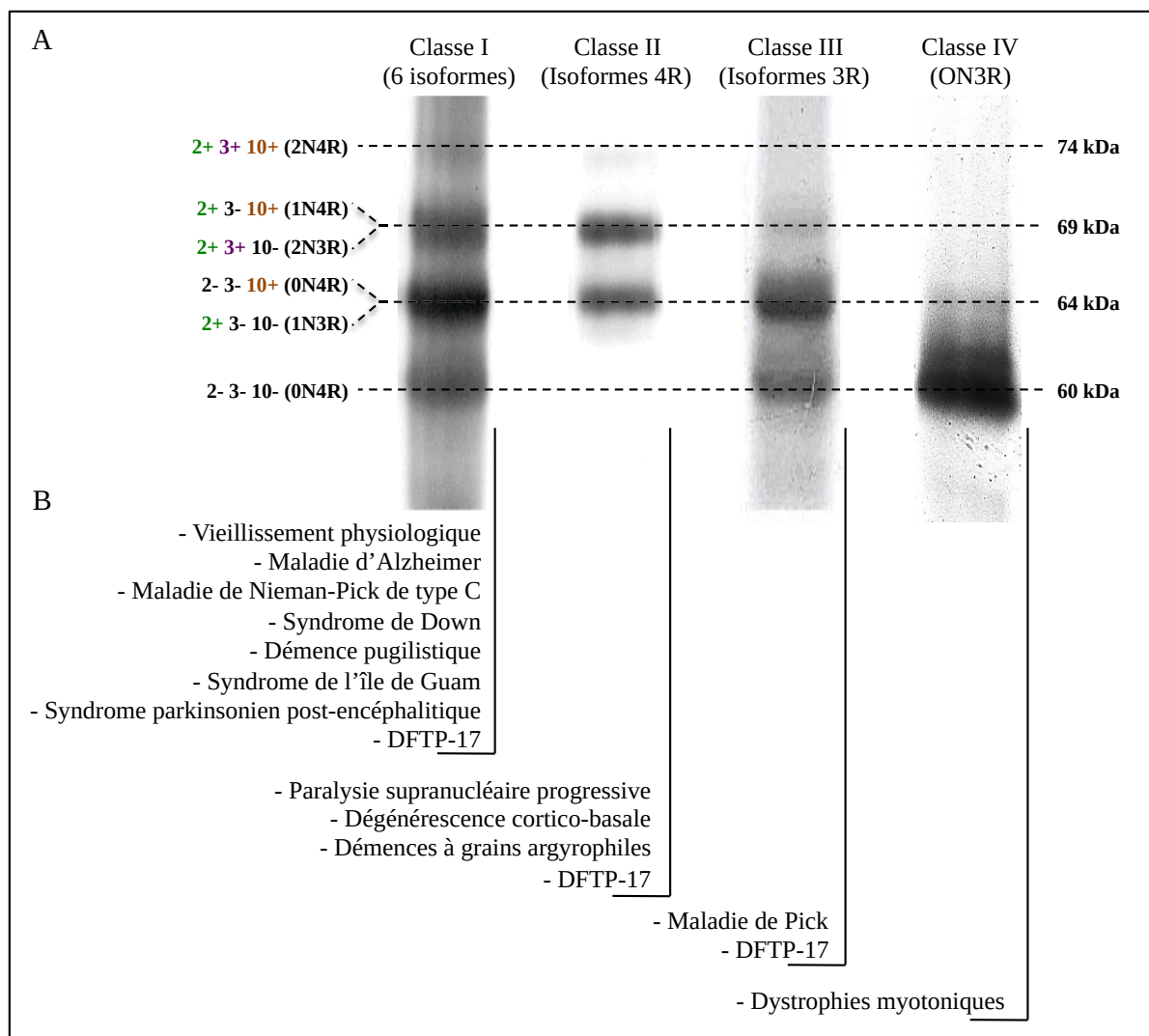


Figure 6 : Code barre et classification des Tauopathies. (A) Western blot tiré de (Sergeant *et al.*, 2005), représentatif du profil électrophorétique des agrégats de protéines Tau provenant de patients atteints de différentes Tauopathies. Les Tauopathies de classe I comprennent les six isoformes de Tau et se caractérisent par un quadruplet électrophorétique allant de 74 kDa à 60 kDa. Les Tauopathies de classes II et III comportent respectivement un triplet électrophorétique de 74, 69 et 64 kDa comprenant les isoformes 4R et un triplet de 69, 64 et 60 kDa correspondant aux isoformes 3R de Tau. La quatrième classe comporte uniquement l'isoforme fœtale et est caractérisée par une immuno-empreinte avoisinant

les 60 kDa. (B) Liste non exhaustive des différentes Tauopathies classées selon leur profil électrophorétique précédemment décrit.

Brièvement, la classe I est représentée par un quadruplet électrophorétique correspondant à l'agrégation de toutes les isoformes de Tau. Ce profil caractéristique a été initialement décrit dans la MA (Goedert et al., 1992; Sergeant et al., 1997) et s'étend désormais à une dizaine de Tauopathies telles que la maladie de Nieman-Pick de type C (NPC) (Love et al., 1995) et les démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (DFTP-17) (Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Les classes II et III sont constituées respectivement d'agrégats de Tau 4R (possédant 4 motifs répétés) et de Tau 3R (possédant 3 motifs répétés). La classe II est représentée entre autres par la PSP, les démences à grains argyrophiles (DGA) et les DFTP-17 (Flament et al., 1991; Delacourte et al., 1996; Buée-Scherrer et al., 1996b). La classe III, quant à elle, comporte la maladie de Pick (Sergeant et al., 1997; Mailliot et al., 1998). Les agrégats protéiques constitutifs de la dernière classe comprennent l'isoforme de Tau la plus courte : l'isoforme fœtale. Cette classe regroupe la dystrophie myotonique (DM) de type I et de type II (Kiuchi et al., 1991).

II.B La maladie d'Alzheimer, une Tauopathie majeure

Le terme « maladie d'Alzheimer » a été utilisé pour la première fois en 1912 par le docteur Emil Kraepelin, professeur du neuropsychiatre allemand Aloïs Alzheimer. Ce dernier présentait en 1907 les descriptions histologiques *post-mortem* d'une patiente atteinte de démence présénile, nommée Auguste Deter, décédée à l'âge de 56 ans et qui souffrait de pertes de mémoire, d'une confusion mentale et d'une inaptitude sociale (Alzheimer et al., 1995) (Traduction anglaise de l'article originel de 1907).

II.B.1 Généralités

La MA est une démence caractérisée par une dégradation progressive et irréversible des fonctions cognitives. Le tableau clinique des patients est évolutif et bien décrit. Les premiers symptômes se traduisent par une perte de la mémoire à court terme (mémoire dite épisodique). L'évolution de la maladie se manifeste par l'altération de nombreuses fonctions cognitives dont le langage (aphasie), la reconnaissance d'objets (agnosie) et de visages (prosopagnosie), l'organisation des mouvements (apraxie), la prise de décision et la planification. Aux derniers stades de la maladie, la perte d'autonomie des patients est totale.

Au niveau épidémiologique, la MA affecterait 25 millions d'individus dans le monde dont près d'un million en France avec 160 000 nouveaux cas par an et les prévisions pour 2040 dépasseraient les 2 millions de cas (d'après l'association France Alzheimer). La maladie se manifeste vers l'âge de 60 ans et représente 75% des démences. Sa prévalence augmente avec le vieillissement, affectant environ 10% des personnes âgées de plus de 65 ans et 25% des personnes âgées de plus de 85 ans ce qui place la MA comme un véritable fléau économique et social (Ferri et al., 2005).

Aujourd'hui, il n'existe aucun traitement curatif pour la MA ; en effet, les traitements symptomatiques actuels visent à retarder l'apparition du déficit cognitif. Le **diagnostic certain** de la maladie n'est obtenu **qu'après un examen neuropathologique post-mortem** des patients.

II.B.2 Lésions neuropathologiques

II.B.2.a Aspects macroscopiques

Macroscopiquement, les cerveaux de patients atteints de la MA présentent une sévère atrophie du tissu cérébral et une augmentation du volume des ventricules cérébraux et des sillons corticaux (**Figure 7A**). Les principales régions touchées sont le lobe temporal médian (hippocampe, cortex transentorhinal et amygdale) et le lobe frontal. Cette atrophie serait le reflet en partie d'une perte neuronale importante entraînant une diminution du ruban cortical et des circonvolutions cérébrales.

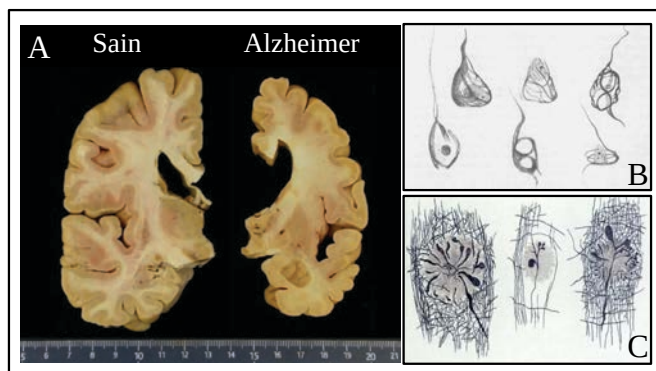


Figure 7 : Aspects macroscopiques et microscopiques de la maladie d'Alzheimer. (A) Photo de coupes coronales de cerveaux d'individu sain et d'un patient atteint de la MA mettant en évidence l'atrophie corticale sévère et l'augmentation des sillons cérébraux (Service d'Anatomie pathologique du CHRU de Lille : Pr Claude Alain Maurage). (B-C) Dessins originaux des dégénérescences neurofibrillaires par Aloïs Alzheimer (B) et des plaques neuritiques comprenant à la fois les DNF et les dépôts amyloïdes par Oscar Fischer (C) (Alzheimer., 1907 ; Fischer., 1907).

II.B.2.b Aspects microscopiques

En 1907, Aloïs Alzheimer et Oscar Fischer, neuropathologiste tchèque, mirent en évidence à l'aide de technique de marquage à l'argent la présence de deux lésions caractéristiques de la MA : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les dépôts amyloïdes (Alzheimer., 1907 ; Fischer., 1907) (Figure 7B et 7C).

II.B.2.b.1 Les dépôts amyloïdes

Les études sur tissu post-mortem indiquent que ces dépôts amyloïdes apparaissent précocement dans la maladie au niveau du néocortex (cortex frontal, pariétal, temporal et occipital) et s'étendent dans des régions plus internes (cortex entorhinal, striatum) pour atteindre le cervelet et le tronc cérébral (Thal et al., 2002). L'observation des dépôts amyloïdes est possible grâce à des techniques d'imprégnation argentique ou par des marquages comme le rouge congo et la thioflavine S (Figure 8A-C).

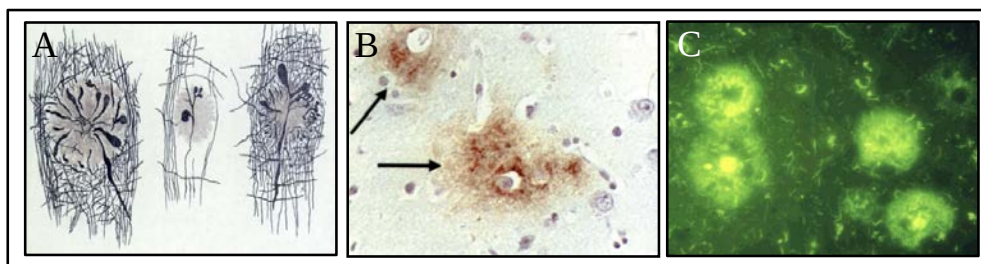


Figure 8 : Observations et techniques de marquages des dépôts amyloïdes. (A) Dessin original d'Oscar Fischer en 1907 des dépôts amyloïdes. (B) Marquage immunohistochimique des lésions via un anticorps anti-A β (CHRU de Lille : Pr Claude Alain Maurage). (C) Microscopie à fluorescence d'un marquage à la thioflavine S qui marque les agrégats protéiques.

Ces dépôts diffus retrouvés dans la matrice extracellulaire ont été déterminés dans les années 80 comme étant largement composés de peptides β -amyloïdes (A β) organisés en feuillets β -plissés (Glenner and Wong, 1984; Glenner et al., 1984; Masters and Selkoe, 2012). Ce peptide A β possède une masse moléculaire d'environ 4,5 kDa et est produit de manière physiologique suite à une série de clivages de son précurseur : l'APP pour « *Amyloid Precursor Protein* » (Kang et al., 1987). L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type I exprimée ubiquitairement dont la fonction aujourd'hui est encore mal connue. Cette protéine est soumise à deux voies cataboliques : la voie amyloïdogénique et la voie non-amyloïdogénique (Figure 9). L'un des produits finaux de la première voie obtenue par l'action séquentielle des β - et γ -sécrétases est le peptide A β (Haass, 2004). La γ -sécrétase peut générer deux types de peptides A β dits A β_{40} (clivé en position 40) et A β_{42} (clivé en position 42) et ces deux peptides constituent les dépôts amyloïdes. La voie non-amyloïdogénique est dite voie de

protection car elle empêche la formation de peptides A β par l'action précoce de l' α -sécrétase qui clive l'APP dans la séquence correspondante à l'A β . De plus, cette voie permet la production de sAPP α qui ont des propriétés neuroprotectrices (Chasseigneaux and Allinquant, 2012). Un déséquilibre entre ces deux voies conduit donc à une accumulation de peptide A β_{40} et A β_{42} et serait à l'origine des dépôts amyloïdes observés dans la MA.

De manière intéressante, il a été découvert des mutations dans le gène de l'APP chez certains patients atteints de la MA. Ces mutations sont donc associées à des formes dites familiales autosomiques dominantes de la MA. Des mutations ont également été décrites dans les gènes codant des enzymes impliquées dans l'activité sécrétase : les présénilines 1 et 2 (enzymes responsables de l'activité γ -sécrétase (Ringman and Coppola, 2013; Loy et al., 2014). Sur l'ensemble des patients atteints de la MA, seul un pourcent présente ces mutations.

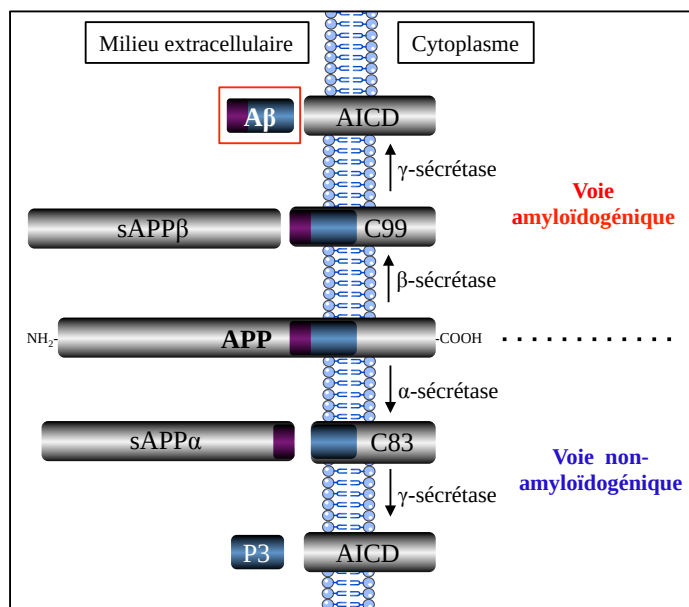


Figure 9 : Les deux voies de catabolisme de l'APP. L'APP est une glycoprotéine transmembranaire physiologiquement soumise à deux voies de dégradation. La première, la voie amyloïdogénique est la voie de production des peptides amyloïdes A β_{40} et A β_{42} par clivage successif du précurseur APP par les β - et γ -sécrétases. La seconde voie dite voie non-amyloïdogénique ne génère pas de peptides A β . Cette voie implique l'action d' α - et γ -sécrétases.

II.B.2.b.2 Les dégénérescences neurofibrillaires

Les années 1985 et 1986 constituent une nouvelle découverte dans le cadre de la MA et le début du Tauïsme. En effet, plusieurs travaux indépendants montrèrent que les DNF sont composées d'agrégats de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées (Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986; Ihara et al., 1986). Ces DNF sont visibles en microscopie électronique sous forme de filaments appariés en hélice, également appelés PHF pour « *Paired Helical Filaments* » (KIDD, 1963) (Figure 10D). L'hyperphosphorylation de Tau concerne des sites qui peuvent être phosphorylés en condition physiologique et pathologique. Elle se manifeste soit par une augmentation du nombre de ces sites phosphorylés au sein d'une même

protéine, soit par l'augmentation du nombre de protéines phosphorylées sur l'un de ces sites. La phosphorylation anormale, quant à elle, correspond à celle observée sur certains sites uniquement en conditions pathologiques. A l'instar des dépôts amyloïdes, les DNF sont observables par des colorations de type Gallyas, Bielchowski, rouge congo et thioflavine S ou à l'aide d'immuno-marquages avec des anticorps dirigés contre la protéine Tau sous formes phosphorylées (Figure 10).

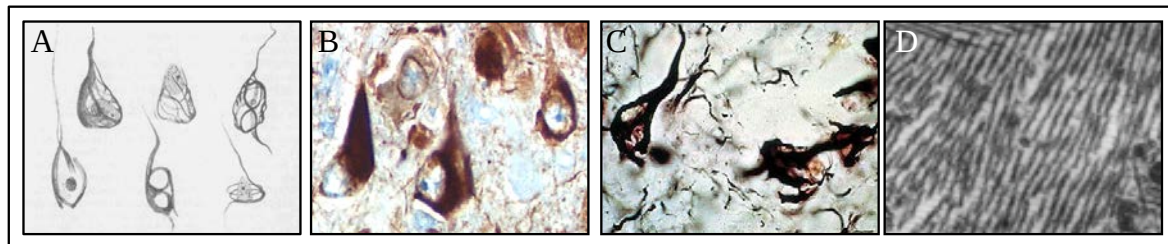


Figure 10 : Observations et techniques de marquage des dégénérescences neurofibrillaires. (A) Dessin original de DNF par Aloïs Alzheimer en 1907. (B) Marquage immunohistochimique de la lésion à l'aide d'anticorps anti-Tau (CHRU de Lille : Pr Claude Alain Maurage). (C) Imprégnation argentique de DNF (CHRU de Lille : Pr Claude Alain Maurage). (D) Image de microscopie électronique de PHFs.

Contrairement aux dépôts amyloïdes, il existe une corrélation entre l'évolution spatiotemporelle des DNF et les signes cliniques observés chez les patients atteints de la MA (Arriagada et al., 1992; Duyckaerts et al., 1997; Delacourte et al., 1999). Des travaux histologiques de Heiko Braak et Eva Braak ont permis de diviser l'évolution de la MA en six stades (Braak and Braak, 1995; Braak et al., 2011). Les stades I et II dits stades « transentorhinaux » sont les plus précoces et sont marqués par un envahissement de la DNF dans le locus coeruleus et la région trans-entorhinale. Les stades III et IV représentent les stades dits « limbiques » de la pathologie avec une progression de la DNF jusqu'à l'hippocampe. Enfin, les stades V et VI dits « isocorticaux » sont les stades les plus sévères avec une atteinte générale de l'isocortex (Figure 11).

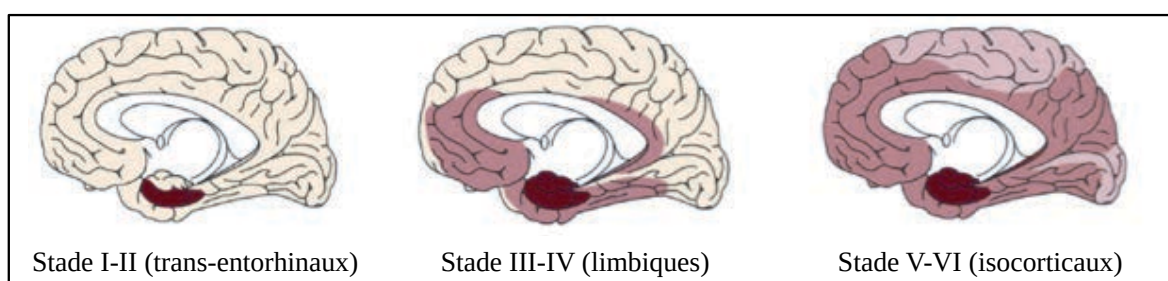


Figure 11 : Evolution de la DNF selon Braak et Braak dans la MA. Les stades précoces de la maladie sont marqués par l'envahissement du cortex enthorinal. Les lésions progressent ensuite dans les aires limbiques pour toucher dans les stades tardifs l'isocortex. Figure tirée de (Braak et al., 2011).

Cette hiérarchisation spatio-temporelle de la DNF pourrait être le reflet d'un caractère propagateur de cette dernière. Bien que le facteur responsable de la progression de la pathologie Tau ne soit pas encore déterminé, des études récentes suggèrent que la progression corticale de la DNF dans la MA pourrait suivre un processus semblable à celui du prion PrP^{Sc}, agent protéique infectieux en cause dans la maladie de Creutzfeldt Jakob. Pour preuve, l'injection intracérébrale d'extraits cérébraux contenant des DNF induit leur propagation au site d'injection par induction de nouvelles lésions (Clavaguera et al., 2009). Ces résultats ont été observés également *in vitro* puisque des agrégats de protéines Tau peuvent être internalisés par des cellules afin d'induire la formation d'une DNF intracellulaire (Frost et al., 2009). Ces études suggèrent donc que des protéines Tau pathologiques seraient capables de transformer des protéines Tau non pathologiques à l'instar de la protéine PrP^C et de son homologue méplié PrP^{Sc}. De plus, ces protéines Tau pathologiques sont capables de véhiculer dans les neurones puisque la surexpression de protéine Tau mutée restreinte au cortex entorhinal conduit à la formation de DNF dans le cortex et dans les neurones voisins sans détection du transgène dans ces derniers (de Calignon et al., 2012). De la même façon, l'injection de vecteurs viraux codant pour la protéine Tau sauvage conduit à une pathologie Tau au site d'injection et dans des régions éloignées du site d'injection sans détection notable du transgène sous forme d'ARN dans les neurones secondaires (Dujardin et al., 2014b). L'ensemble de ces travaux prouve donc que, dans la MA, Tau se comporte comme un véritable agent infectieux capable d'une part, de se propager de neurone en neurone, et d'autre part, d'induire de nouvelles lésions à partir de protéines Tau endogènes dans les neurones ciblés (Hyman, 2014).

II.B.3 Interaction entre les deux lésions au niveau de la synapse

La nature de la relation, si elle existe, entre les plaques amyloïdes et les DNF observées dans la MA reste encore indéterminée. Chronologiquement, les DNF apparaissent avant les plaques amyloïdes et seule l'évolution spatio-temporelle de la DNF est corrélée avec le déclin cognitif observé chez les patients (Delacourte et al., 1999; 2002; Braak and Del Tredici, 2004). A l'échelle moléculaire, les DNF étant intracellulaires et les dépôts amyloïdes étant extracellulaires ; il est conceptuellement difficile d'envisager une véritable interaction physique. Néanmoins, certains travaux soulèvent que **ces deux lésions histopathologiques agissent en synergie dans la perte synaptique observée dans la MA** (Crimins et al., 2013; Spires-Jones and Hyman, 2014).

La plasticité synaptique peut être considérée comme le mécanisme moléculaire qui reflète l'apprentissage et la formation de la mémoire et qui peut se schématiser par une modulation constante des connexions entre les neurones. Dans la MA, une perte synaptique sévère est observée en corrélation avec les symptômes cliniques (DeKosky and Scheff, 1990; Terry et al., 1991; Masliah et al., 1994). L'un des premiers indices qui suggère que la dysfonction synaptique est liée à une action des deux lésions provient de travaux montrant que l'invalidation génique de Tau, dans un modèle murin de pathologie amyloïde, permet de pallier aux déficits cognitifs observés chez ces animaux et de réduire le risque de développer des troubles induits en modulant l'activité des récepteurs synaptiques (Roberson et al., 2007). Ultérieurement, des travaux réalisés au sein de cultures primaires d'hippocampes ont démontré que l'application d'oligomères d'A β conduit à une perte synaptique spécifiquement au sein des neurones qui présentent une délocalisation synaptique de Tau (Zempel et al., 2010). Cet effet délétère de Tau serait associé à son implication dans le recrutement de Fyn au sein du compartiment post-synaptique en réponse à l'A β (Ittner et al., 2010). L'ensemble de ces résultats suggère donc qu'une réduction de la protéine Tau, pourrait être bénéfique dans le cadre de la MA.

Pour conclure, les différences remarquées dans le profil électrophorétique des agrégats de protéine Tau dans les Tauopathies ne sont pas totalement expliquées. Les mécanismes qui vont conduire aux lésions histopathologiques observées dans les Tauopathies comme la DNF dans le cadre de la MA ne sont pas clairement élucidés. Il existe de nombreuses hypothèses pour expliquer la formation de lésions et la mort neuronale observées dans ces pathologies: une perte de(s) fonction(s) de la protéine Tau, un gain de fonction toxique, une dérégulation de l'épissage entraînant un déséquilibre du ration d'isoforme 3R/4R dans le cerveau, ou encore, une dérégulation des modifications post-traductionnelles de la protéine Tau.

Chapitre 2 : Les modifications post-traductionnelles de Tau : régulatrices de sa biologie et de sa physiopathologie

Les modifications post-traductionnelles (MPT) sont des modifications chimiques affectant les protéines, exécutées le plus souvent par une enzyme après leur synthèse. Ces modifications chimiques comprennent l'addition d'un groupe fonctionnel (acétylation, glycosylation, phosphorylation) ou d'une protéine (ubiquitinylation, sumoylation), le changement de la nature d'un acide aminé (déamidation, déimination) et des changements structuraux (isomérisation, troncation, oxydation et réduction des ponts disulfures). Le développement des outils de prédiction *in silico* et des techniques analytiques de protéomique a permis de mettre en évidence l'existence de plus de 300 MPT. Ces MPT affectent l'activité, la localisation subcellulaire, la stabilité ou la structure de la protéine ciblée.

Tau est sujette à un ensemble complexe de nombreuses modifications post-traductionnelles : phosphorylation, acétylation, méthylation, isomérisation, glycation, nitration, ubiquitinylation, sumoylation, O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAc) et troncation. Parmi ces MPT, certaines ne sont retrouvées qu'en conditions pathologiques (troncation, glycation, polyamination) alors que d'autres, qui présentent de véritables fonctions physiologiques, se retrouvent dérégulées dans la MA et les autres Tauopathies (phosphorylation, glycosylation, nitration). Ainsi, une dérégulation globale des MPTs affectant Tau est proposée comme étant l'une des hypothèse principale par laquelle la protéine Tau devient une entité pathologique dans les Tauopathies.

I. La phosphorylation

Au milieu des années 1950, Edwin Krebs et Edmon Fisher travaillaient sur les mécanismes énergétiques des cellules musculaires. Ils ont découvert qu'une enzyme dénommée la phosphorylase était activée en présence d'ATP et que cette réaction était catalysée par une kinase. Inversement, l'élimination d'un groupement phosphate par une phosphatase sur la phosphorylase inactivait cette dernière. Ces travaux leur valurent le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1972 pour la découverte de **la phosphorylation réversible des protéines** (Fischer and Krebs, 1955; Krebs and Fischer, 1956; Cohen, 2002).

La phosphorylation est donc une MPT dynamique, qui consiste en l'ajout d'un groupement phosphate PO_4^{3-} sur des molécules ou sur les résidus Sérine (Ser), Thréonine (Thr) ou Tyrosine (Tyr) des protéines par l'estérification de leur fonction hydroxyle de la chaîne latérale. La phosphorylation est une modification majeure sur Tau puisque celle-ci comporte 67 à **85 sites potentiellement phosphorylables** selon l'isoforme considérée, ce qui représente **20% de la protéine totale** et qui permet de définir Tau comme une phosphoprotéine (Butler and Shelanski, 1986) ([Tableau 1](#)). La phosphorylation de Tau est finement régulée par un ensemble de kinases et de phosphatases.

Isoforme (épissage)	Nbr d'AA	Nbr de Ser	dont Ser/Pro	Nbr de Thr	dont Thr/Pro	Nbr de Tyr	Total de sites potentiels de phosphorylation
ON3R (2-3-10-)	352	36	6	26	8	5	67
1N3R (2+3-10-)	381	41	7	31	10	5	77
2N3R (2+3+10-)	410	41	7	35	10	5	81
0N4R (2-3-10+)	383	40	6	26	8	5	71
1N4R (2+3-10+)	412	45	7	31	10	5	81
2N4R (2+3+10+)	441	45	7	35	10	5	85

Tableau 1 : Enumération des sites potentiels de phosphorylation en fonction des six isoformes de Tau. (Ser: Sérine, Pro : Proline, Thr : Thréonine, Tyr : Tyrosine, Nbr : nombre, AA : acide aminé).

I.A Les kinases et les phosphatases de Tau

Plus d'une vingtaine de kinases divisées en trois groupes selon le type de l'épitope ciblé peuvent phosphoryler la protéine Tau *in vitro* et/ou *in vivo* ; 1) le groupe des PDPK pour « *Proline Directed Protein Kinases* » qui phosphorylent Tau sur les résidus Ser ou Thr suivis d'un résidu Pro, 2) le groupe non-PDKP qui comprend des kinases phosphorylant Tau sur des résidus Ser et Thr non suivis par une Pro, 3) enfin, le dernier groupe comprend les tyrosines kinases ([Tableau 2](#)) (Sergeant et al., 2008; Hanger et al., 2009).

PDPK	non-PDPK	Tyr-Kinases
Cdk1	CaMKII	Src kinases
Cdk2	CK1	C-abl
Cdk5	CK2	
GSK3 α	DYRK	
GSK3 β	GSK3 α	
LRRK2	GSK3 β	
MAPK (Erk1/2)	MARK	
SAPK1 γ /JNK	Phosphorylase kinase	
SAPK2 α /p38	PKA	
SAPK2 β	PKB/AKT	
SAPK3	PKC	
SAPK4	PKN	
	TTK	

Tableau 2 : Les trois classes de kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau *in vitro* ou *in vivo*. Cdk : Cyclin-dependant kinase, GSK : Glycogen Synthase Kinase, LRRK2 : Leucine-Rich Repeat Kinase 2, MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase, SAPK : Stress-Activated Protein Kinase, CaMK : Calmodulin-dependant protein Kinase, CK1, CK2 : Caséine Kinase 1 et 2, DYRK : Dual specificity Tyrosine Regulated Kinase, MARK : Microtubule Affinity-Regulating Kinase, PKA, PKB, PKC et PKN : Protein Kinase A, B, C et N, TTK : Tau Tubuline Kinase, C-abl : Kinase Abelson

Il existe donc une grande complexité dans les mécanismes de régulation de la phosphorylation de Tau. Parmi ces kinases, GSK3 β , qui appartient à la fois au groupe des PDPK et des non-PDPK, est l'une des kinases majeures de Tau (LLorens-Martin et al., 2014) puisqu'elle est capable de phosphoryler Tau *in vitro* sur 36 sites (Reynolds et al., 2000; Hanger et al., 2007). Les phosphatases de Tau ont également fait l'objet de nombreuses études. *In vitro* ; les phosphatases PP1 pour « Protein Phosphatase 1 », PP2A, PP2B et PP5 sont capables de déphosphoryler Tau (Liu et al., 2005b). Il est à noter que PP2A est la phosphatase qui présente l'activité la plus importante au niveau cérébral (Liu et al., 2005b). Ceci suggère que cette dernière serait la phosphatase la plus impliquée dans la déphosphorylation de Tau (Martin et al., 2013).

Comme Tau est une phosphoprotéine, il existe une multitude de travaux qui se sont intéressés aux conséquences de la phosphorylation vis-à-vis de sa biologie, que ce soit au niveau de sa fonction de régulateur de la dynamique microtubulaire, ou de sa localisation cellulaire et aux fonctions associées.

I.B La phosphorylation de Tau comme régulateur de sa biologie

Les premiers travaux s'intéressant aux conséquences de la phosphorylation de Tau vis-à-vis de sa biologie, notamment de sa fonction de régulateur de la dynamique microtubulaire, datent de 1984. Ces travaux montrèrent que les protéines Tau déphosphorylées présentaient une meilleure capacité à polymériser la tubuline soluble en microtubules (Lindwall and Cole, 1984). Le développement d'outils immunologiques spécifiques d'épitopes phosphorylés a permis de localiser précisément quels étaient les sites majeurs impliqués. En outre, la phosphorylation de Tau par les MARK sur les séquences KXGS des résidus Ser262, Ser293, Ser324 et Ser356 localisées respectivement dans les motifs R1, R2, R3 et R4 entraîne une perte drastique de l'interaction de Tau aux microtubules (Drewes et al., 1995; 1997) et des changements de conformation des motifs répétés (Fischer et al., 2009). En fait, la phosphorylation de la Sérine 262 serait critique pour rompre l'interaction de Tau aux microtubules (Biernat et al., 1993; Sengupta et al., 1998; Schneider et al., 1999). De la même façon, la phosphorylation des résidus Thr231 et Ser235 localisés dans le domaine riche en prolines P2 par GSK3 β diminue l'affinité de Tau aux microtubules (Sengupta et al., 1998; Cho and Johnson, 2003; 2004) ce qui reflète l'importance de ce domaine dans la régulation de la dynamique microtubulaire. De façon générale, il existe un équilibre de l'état de

phosphorylation de Tau contrôlé par les kinases et les phosphatases qui régule l'interaction de Tau avec les microtubules (Figure 12).

A côté de son implication dans la régulation de la dynamique microtubulaire, l'état de phosphorylation de Tau module le transport axonal et la croissance neuritique pendant la différenciation neuronale. En effet, il a été montré, en infectant des cellules d'insectes avec des constructions de Tau mutées (mutations KXGA dans les motifs répétés), que la phosphorylation de Tau était nécessaire à la formation de processus neuritiques (Biernat and Mandelkow, 1999). Au niveau du transport axonal, il apparaît qu'une diminution de la phosphorylation est corrélée avec une baisse du transport et inversement, qu'une augmentation de la phosphorylation de Tau favorise la motilité des vésicules le long des microtubules axonaux. En effet, la co-expression de GKS3 β et de Tau dans un modèle murin ou chez la drosophile prévient des troubles du transport axonal observés chez les animaux surexprimant seulement Tau (Spittaels et al., 2000; Mudher et al., 2004). De même, l'inhibition pharmacologique de cette kinase *in cellulo* conduit à une déphosphorylation de Tau corrélée à une délocalisation des mitochondries reflétant une dérégulation du transport axonal (Tatebayashi et al., 2004). Une étude plus récente suggère que la phosphorylation de Tau sur les résidus Ser199, Ser202 et Thr205 (épitope AT8) entraîne des changements conformationnels qui vont augmenter l'espacement entre les microtubules conduisant à des forces de répulsion entre les microtubules. Ces dernières gêneront le déplacement des organites le long du réseau microtubulaire (Shahpasand et al., 2012). Ces travaux illustrent le fait que Tau peut indirectement réguler la transport axonal.

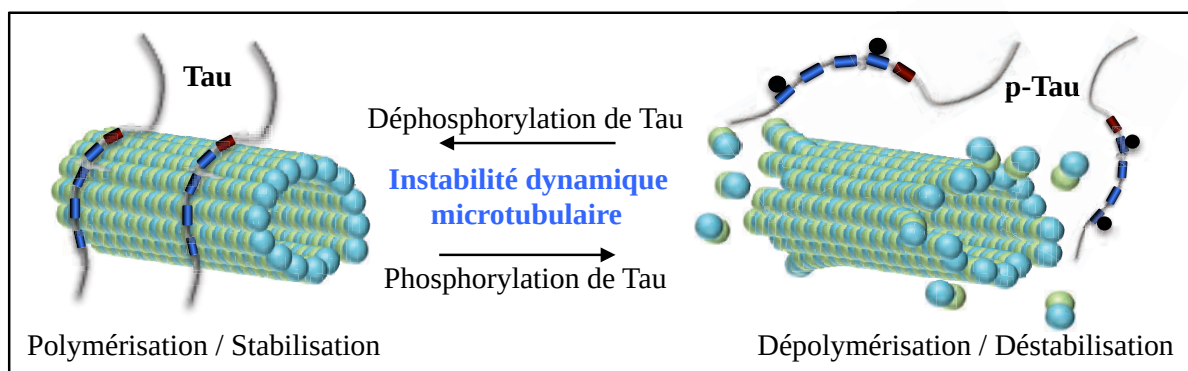


Figure 12 : Régulation de la dynamique microtubulaire par l'état de phosphorylation de Tau. Les formes phosphorylées de Tau présentent une capacité moins importante à lier les microtubules à l'inverse des formes déphosphorylées. L'état de phosphorylation de Tau, modulé par les kinases et les phosphatases, régule donc cet équilibre entre microtubules polymérisés et dépolymérisés, reflet de l'instabilité dynamique des microtubules. La phosphorylation de Tau sur deux des sites majeurs (Ser262 et Ser356) est schématisée par une sphère noire dans les motifs R1 et R4.

L'implication de la phosphorylation dans la biologie de Tau ne se limite pas à la régulation de la dynamique microtubulaire et aux fonctions associées. En effet, il semble que la phosphorylation peut médier la localisation subcellulaire de Tau et les conséquences cellulaires qui en découlent.

En illustration, des études ont démontré que des préparations membranaires réalisées à partir de lignées cellulaires étaient enrichies en protéines Tau déphosphorylées au niveau des résidus Ser202/Thr205, Thr231 et Ser396/Ser404 (Arrasate et al., 2000; Ekinci and Shea, 2000; Maas et al., 2000; Pooler and Hanger, 2010). De plus, l'utilisation de l'acide okadaïque (inhibiteur des phosphatases) conduit à une hyperphosphorylation de Tau et à une perte de la présence de Tau dans ces fractions enrichies en membranes (Maas et al., 2000). Des travaux additionnels dans des cultures primaires corticales de rat valident ces résultats et mettent en avant l'implication des kinases GSK3 β et CK1 dans la phosphorylation et la localisation de Tau puisque leur inhibition pharmacologique augmente le « pool » de Tau associée à la membrane (Pooler et al., 2012).

Pour conclure, la phosphorylation de Tau affecte sa localisation subcellulaire en entraînant une diminution de son affinité pour les microtubules et la membrane plasmique. La phosphorylation module également sa localisation nucléaire puisque ce sont majoritairement des formes déphosphorylées qui se retrouvent dans ce compartiment (Lu et al., 2014). Il n'est pas encore défini si ces événements sont successifs ou simultanés. Existe-il des sites de phosphorylation spécifiques qui adressent Tau vers un compartiment cellulaire ? Ainsi, une dérégulation de la phosphorylation de Tau par une augmentation des activités kinases ou par une diminution des activités phosphatases provoquerait une accumulation de Tau au niveau cytoplasmique qui pourrait s'avérer délétère si elle n'est pas éliminée.

I.C La dérégulation de la phosphorylation de Tau dans la MA

Les Tauopathies possèdent comme caractéristique commune de présenter des protéines Tau agrégées sous formes hyper- et anormalement phosphorylées. Pour rappel, l'hyperphosphorylation se manifeste soit par une augmentation du nombre de sites phosphorylés au sein d'une même protéine, soit par l'augmentation du nombre de protéines phosphorylées sur un de ces sites. La phosphorylation anormale correspond à celle observée sur certains sites

uniquement en condition pathologique (Ksiezak-Reding et al., 1992; Köpke et al., 1993). Dans la MA qui est la Tauopathie la plus fréquente, la conjonction de ces deux types de phosphorylation mène approximativement à la phosphorylation de 45 sites sur 81, détectable par des outils immunologiques ou par spectrométrie de masse (Noble et al., 2013). Ces sites se localisent majoritairement dans les domaines riches en prolines et dans la queue carboxy-terminale (Figure 13).

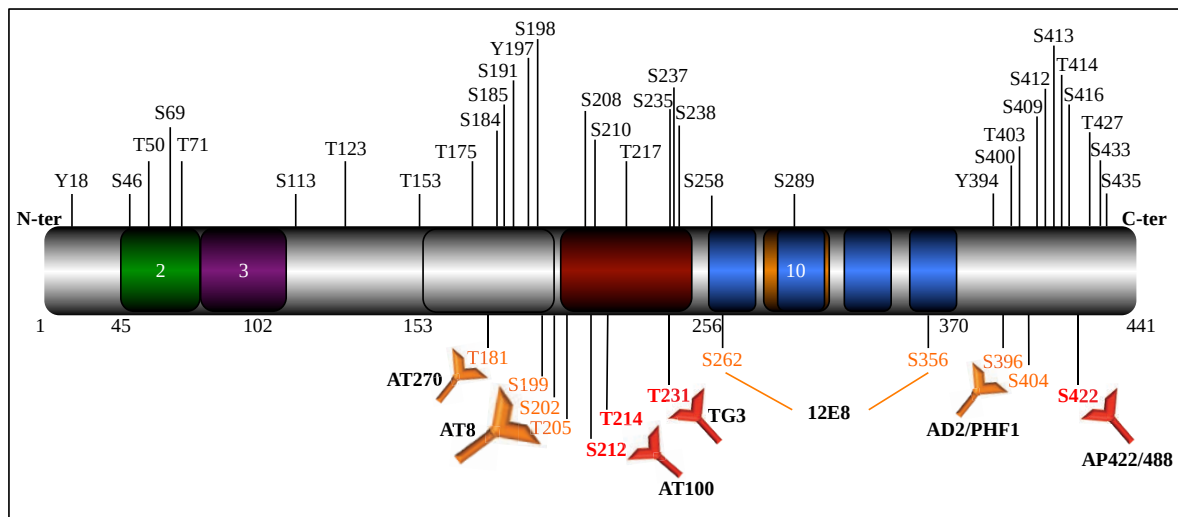


Figure 13 : Le phosphorylome de Tau dans la maladie d'Alzheimer. Les outils immunologiques et protéomiques ont permis l'identification de 45 sites de phosphorylation dans les tissus cérébraux de patients atteints de la MA. Les principaux anticorps utilisés dans la littérature qui ciblent des épitopes d'hyper-phosphorylation et de phosphorylation anormale sont représentés respectivement en orange (AT270, AT8, 12E8, AD2/PHF1) et en rouge (AT100, TG3, AP422/488). Figure adaptée de la revue de (Noble et al., 2013).

Le développement de nombreux outils immunologiques a permis de mettre en évidence que les épitopes suivants étaient très peu phosphorylés sur les protéines Tau normales en comparaison aux protéines Tau pathologiques, en exemple : AT270 (Goedert et al., 1994), AT8 (Mercken et al., 1992; Porzig et al., 2007), AT180 (Goedert et al., 1994), 12E8 (Seubert et al., 1995; Litersky et al., 1996), AD2/PHF1 (Otvos et al., 1994; Condamines et al., 1995; Buée-Scherrer et al., 1996a) (Figure 13). Par ailleurs, d'autres anticorps mettent en évidence des sites de phosphorylation dite anormale : AT100 (Hoffmann et al., 1997), TG3 (Jicha et al., 1997b) et AP422/988 (Hasegawa et al., 1996; Bussière et al., 1999). Les épitopes reconnus par ces anticorps sont donc retrouvés uniquement dans des cerveaux de patients atteints de la MA. De manière intéressante, il semble qu'il y ait une cor relation entre l'apparition de ces épitopes et la formation de la DNF (Augustinack et al., 2002). En effet, la phosphorylation des résidus reconnus par les anticorps 12E8 et TG3 serait plutôt un  v nement précoce cor l  avec l'apparition de la DNF alors que celle des résidus reconnus par les anticorps AT8 ou AD2

serait relativement tardive. De plus, la phosphorylation de Tau entraînerait des modifications conformationnelles avec l'apparition de nouveaux épitopes (MC1 ou Alz50) détectés uniquement dans la MA (Jicha et al., 1997a; 1997b; Ghoshal et al., 2002).

La présence de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées dans les neurones en DNF suggère donc que cette dérégulation de phosphorylation joue un rôle dans la pathologie. Ainsi, de nombreux travaux se sont intéressés aux conséquences d'une dérégulation des activités kinases et phosphatases comme potentialisateurs de la pathologie Tau. Une injection intra-péritonéale de chlorure de lithium (LiCl) ou un régime riche en LiCl administré dans des modèles murins conduisent à une inactivation de GSK3 β et permettent de diminuer la phosphorylation de Tau sur plusieurs épitopes et d'abaisser le nombre de neurones en DNF dans des modèles de Tauopathies (Muñoz-Montaña et al., 1997; Engel et al., 2006; Caccamo et al., 2007). La surexpression d'autres kinases telles que CDK5 dans un modèle murin conduit à une hyperphosphorylation de Tau et également à la formation de DNF au niveau cortical et hippocampique (Cruz et al., 2003). De même, celle de LRRK2 dans un modèle de Tauopathie exacerbe la pathologie Tau (Bailey et al., 2013). De la même façon, la surexpression de la Tau Tubuline Kinase 1 *in vivo* conduit à une hyper-phosphorylation de Tau corrélée à une activation des kinases GSK3 β et CDK5 suivie de formations de DNFs (Xu et al., 2010). Moduler l'expression ou l'activité des kinases étant une approche trop générale, d'autres approches plus ciblées ont également été développées afin d'étudier les conséquences de la dérégulation de la phosphorylation de Tau. A cet effet, des modèles de drosophiles de surexpression de Tau mutées sur tous les sites Thr-Pro et Ser-Pro en Ala-Pro ont été générés et de manière intéressante aucune dégénérescence rétinienne n'est observée dans ces modèles à l'inverse des mutants drosophiles Glu-Pro, mimant donc une phosphorylation sur ces sites ; prouvant ainsi que la phosphorylation sur ces motifs conduit à une mort neuronale chez les drosophiles (Dias-Santagata et al., 2007; Fulga et al., 2007; Steinhilb et al., 2007a; 2007b). *In vitro*, l'utilisation de protéines Tau phosphorylées sur certains sites co-incubées avec des agents de nucléation accélère son agrégation en comparaison à leurs homologues non phosphorylées (Santa-Maria et al., 2004; Liu et al., 2007).

En résumé, l'hyper- et la phosphorylation anormale observées dans la maladie d'Alzheimer vont conduire d'une part à une perte de fonction physiologique de Tau par détachement des microtubules et par une dérégulation des fonctions associées, et d'autre part, à un gain de fonction pathologique en favorisant son agrégation. La phosphorylation participe donc activement à la biologie et à la physiopathologie de Tau ce qui lui a valu d'être longtemps

considérée comme la MPT majeure de Tau. Néanmoins, d'autres modifications post-traductionnelles moins étudiées ont suscité l'intérêt de la communauté Tauiste au fil des années vis-à-vis de la biologie et de la physiopathologie de Tau.

II. La Glycosylation

II.A. La O-N-Acetylglucosaminylation (O-GlcNAc)

La O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle dynamique découverte dans les années 1980 qui consiste en l'ajout d'un résidu de N-acétyl-glucosamine sur une Sérine ou une Thréonine (le plus souvent au niveau des séquences « PEST ») des protéines. Pour cela, cette MPT est souvent considérée comme compétitrice directe de la phosphorylation (Torres and Hart, 1984). Le dynamisme de la O-GlcNAc est régulé par deux enzymes : la β -N-acetylglucosaminyl transférase (OGT) et la N-acétyl- β -D glucosaminidase (OGA) ([Figure 14](#)). L'OGT est une glycosyltransférase dont le nucléotide sucre donneur est l'Uridine DiPhospho N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc). La O-GlcNAc est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation transcriptionnelle et traductionnelle, la dégradation des protéines, leur trafic et l'activation de voies de signalisation cellulaire (Hart et al., 2011).

La O-GlcNAcylation de Tau fut mise en évidence de façon globale avec l'utilisation de lectines (molécules ayant une très forte affinité pour les oses) spécifiques des résidus O-GlcNAcylés sur des protéines Tau isolées de cerveaux bovins (Arnold et al., 1996) et humains (Liu et al., 2004). Clairement, les sites de O-GlcNAcylation ne sont pas encore connus chez l'Homme mais de nombreuses études dans des modèles cellulaires ou murins mettent en avant le rôle important de cette MPT en la confrontant à la phosphorylation. En effet, la relation entre la phosphorylation et la O-GlcNAc se reflète sur Tau (Liu et al., 2009a) puisqu'une inhibition pharmacologique de l'OGA (l'enzyme responsable de la libération du résidu Glc-NAc sur les résidus Ser et Thr) dans des lignées cellulaires conduit à une diminution de la phosphorylation sur certains épitopes : Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Ser262, Ser396, Ser422 (Liu et al., 2004; Yuzwa et al., 2008). De la même façon, l'utilisation de thiamet-G (inhibiteur spécifique de l'OGA) *in vivo* diminue la phosphorylation de Tau sur les résidus suivants : Thr231, Ser396 et Ser422.

Dans la MA, il est observé une diminution générale des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines (Liu et al., 2009a) corrélée avec une baisse globale de la concentration intra-

neuronale de glucose et des récepteurs membranaires impliqués dans l'internalisation du glucose au sein des neurones (Liu et al., 2008). Ceci pourrait en partie expliquer l'augmentation de la phosphorylation observée dans la MA et soulever un rôle protecteur de la *O*-GlcNAc vis-à-vis de Tau (Figure 14). De plus, il a été montré *in vitro* que la *O*-GlcNAcylation de Tau sur la Ser356 (Yu et al., 2008a) et sur la Ser400 (Yuzwa et al., 2012) ralentit l'agrégation de Tau et que l'inhibition de l'OGA dans des modèles murins de Tauopathies par un traitement chronique au thiamet-G diminuerait le nombre de neurones en DNF (Yuzwa et al., 2012; Graham et al., 2013). L'ensemble de ces observations laisse entrevoir des perspectives intéressantes quant au rôle de la *O*-GlcNAc dans la MA.

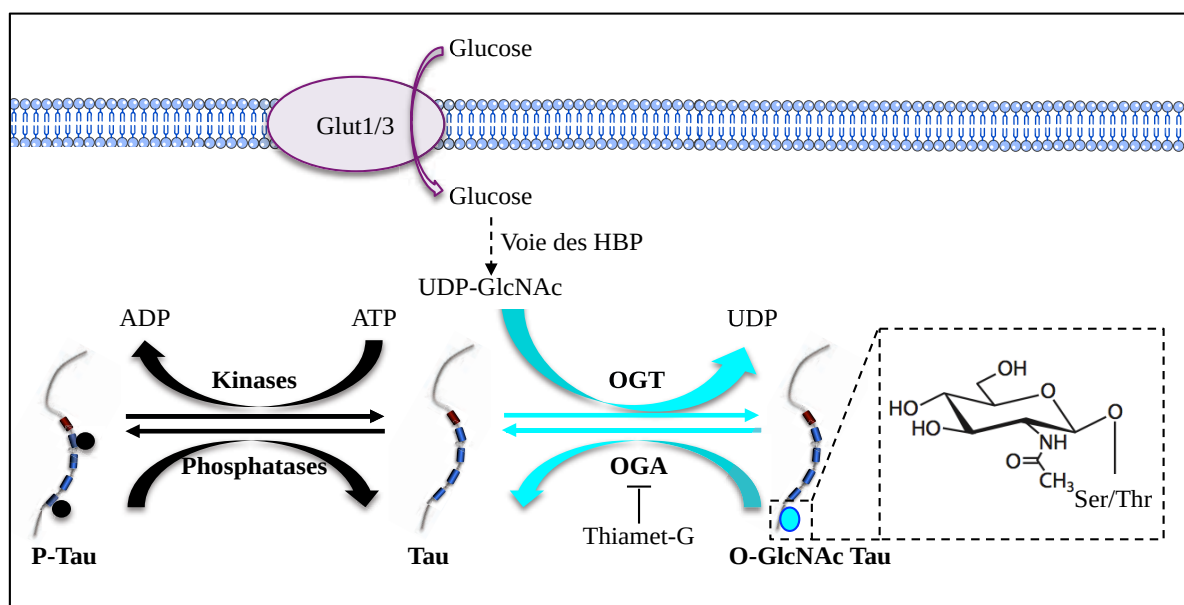


Figure 14 : Equilibre entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation de Tau. L'UDP-GlcNAc, substrat de l'OGT, est produit à partir du glucose via la voie HBP (Hexosamine Biosynthesis Pathway). Ce précurseur glucidique est greffé sur les résidus Sérine ou Thréonine des protéines ciblées par l'OGT. Il existe un équilibre physiologique entre la phosphorylation de Tau et sa GlcNAcylation régulées respectivement par des kinases/phosphatases et OGT/OGA.

II.B La N-Glycosylation

La N-glycosylation est une modification co-translationnelle stable qui consiste en l'ajout d'un N-Glycane sur les résidus Asn des séquences Asn-X-Ser/Thr et qui se déroule dans la lumière du réticulum endoplasmique (Breitling and Aeby, 2013). Cette modification est généralement retrouvée sur les protéines transmembranaires ou sécrétées.

En 1996, il a été montré que certaines lectines spécifiques des N-glycanes étaient capables de marquer des PHFs extraits de cerveaux de patients atteints de la MA (Wang et al., 1996; Liu et al., 2002). De plus, un co-traitement des PHFs par la PNGase-F (enzyme capable

d'hydrolyser la liaison entre un résidu Asn et un GlcNAc point d'attache du cœur des N-Glycanes) et des phosphatases entraînait une solubilisation des protéines Tau et restaurait leur activité de régulateur de la dynamique microtubulaire (Wang et al., 1996). Ces travaux suggèrent donc que la protéine Tau agrégée dans les PHFs serait N-Glycosylée. Une étude ultérieure a mis en évidence qu'il existait plus d'une dizaine de N-glycanes différents dans les PHFs de Tau (Sato et al., 2001).

Le fait que Tau, une protéine cytosolique traduite par des ribosomes cytosoliques, soit retrouvée N-glycosylée n'est pas encore élucidé. De plus, cette N-glycosylation de Tau est exclusivement détectée dans les PHFs. L'une des hypothèses proposées serait qu'une altération de la localisation subcellulaire de Tau sous forme soluble ou agrégée rendrait Tau accessible aux enzymes de la N-glycosylation.

III. La prolyl cis-trans isomérisation

Parmi les vingt acides aminés constitutifs des protéines, la proline est l'unique acide aminé capable d'adopter une conformation cis ou trans, ce qui lui permet d'agir comme un pivot contrôlé par une MPT appelée la cis-trans isomérisation. Ce changement conformationnel peut être catalysé par un groupe d'enzymes : les peptidyl prolyl cis-trans isomérases (PPI) (Lu et al., 2007). Pin1, l'une des PPI majeure chez les eucaryotes, est impliquée dans divers processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, l'apoptose et la transcription (Wulf et al., 2005). Pin1 cible donc des prolines mitoyennes de résidus sérine ou thréonine phosphorylés (Wintjens et al., 2001). Tau comporte de nombreux motifs Ser/Thr-Pro phosphorylables (cf tableau 1), Pin1 pourrait donc être un protagoniste majeur dans la biologie et la physiopathologie de la protéine Tau.

Ainsi, il a été montré que Tau et Pin1 interagissent ensemble au niveau des résidus pThr²³¹Pro²³² (Lu et al., 1999). En outre de la Thr231, Pin1 est également capable de se lier aux résidus Ser202, Thr205, Thr212, Ser235 et la Ser404 *in vitro et in cellulo* (Smet et al., 2004; Kimura et al., 2013). Des changements de conformation de cis à trans conduisent à une diminution de l'encombrement stérique des chaînes latérales voisines de la proline et de ce fait, à une meilleure accessibilité pour des phosphatases. Ainsi, l'isomérisation de Tau de cis à trans par Pin1 facilite la déphosphorylation de Tau par PP2A sur la Thr231 (Zhou et al., 2000; Lavoie et al., 2003; Hamdane et al., 2006) (Figure 15). Comme l'une des conséquences fonctionnelles de la phosphorylation de Tau sur cette Thr231 par la kinase CDK1 est la perte d'interaction avec les microtubules (Vincent et al., 1997; Sengupta et al., 1998; Cho and

Johnson, 2003; 2004), Pin1 est donc capable d’agir comme un modulateur de la liaison de Tau aux microtubules et de leur polymérisation soit en empêchant la phosphorylation de Tau (Lu et al., 1999), soit en favorisant sa déphosphorylation (Zhou et al., 2000). Récemment, le développement d’anticorps spécifiques des conformations cis et trans de la Thr231 a permis d’apporter de nouvelles pistes intéressantes quant au rôle de Pin1 vis-à-vis de la physiopathologie de Tau. En accord avec les résultats précédents, la conformation trans favorise l’interaction de Tau avec les microtubules et leur polymérisation (Nakamura et al., 2012). A l’inverse, la conformation cis apparaît délétère pour la cellule car elle défavorise la déphosphorylation de Tau par PP2A, prône l’agrégation de Tau et est majoritaire dans les neurones en DNF (Nakamura et al., 2012).

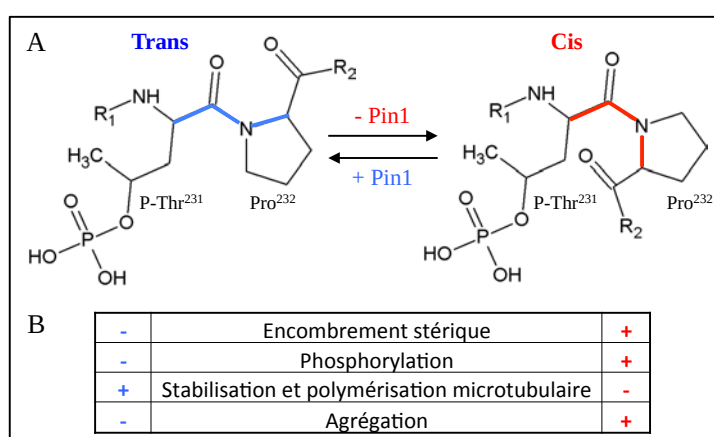


Figure 15 : Représentation schématique de l’isomérisation cis/trans des résidus pThr²³¹Pro²³² par Pin1 et conséquences associées. (A) Pin1 est une peptidyl prolyl cis trans isomérase impliquée dans les changements de conformation de Tau notamment au niveau des résidus pThr²³¹Pro²³². (B) L’isomère trans présente un encombrement stérique léger ce qui favorise sa déphosphorylation et son interaction avec les microtubules à l’inverse de l’isomère cis qui lui est délétère pour la cellule.

De manière intéressante, l’expression de Pin1 est diminuée dans la MA (Liou et al., 2003; Butterfield et al., 2006). De plus, il apparaît que Pin1 interagit avec des PHF extraits de cerveaux de patients atteints de la MA immuno-marqués avec l’anticorps TG3 (Lu et al., 1999) et que Pin1 co-localise avec des agrégats de Tau dans la maladie de Pick et dans certaines DFTP-17. Ceci suggère qu’en conditions pathologiques, Pin1 n’est plus capable d’assurer ses fonctions physiologiques soit par une perte d’expression soit par une capture de Pin1 par les agrégats de Tau. Par ailleurs, l’extinction génique de Pin1 chez la souris cause une neuropathie progressive avec des déficits moteurs et cognitifs, une hyperphosphorylation de Tau, des inclusions neuronales de Tau et une dégénérescence des neurones (Liou et al., 2003; Lim et al., 2008). Ces résultats indiquent qu’une perte de fonction de Pin1 conduit à une mort neuronale et mettent en évidence son rôle d’acteur dans l’intégrité neuronale.

Récemment, une nouvelle protéine de la famille des PPI, FKBP52, a été décrite comme interagissant avec Tau (Chambraud et al., 2010). Bien qu'il n'est pas encore établi si FKBP52 est impliquée dans l'isomérisation de Tau, cette PPI est capable de moduler les propriétés de Tau soit en inhibant la polymérisation microtubulaire induite par Tau et le développement neuritique (Chambraud et al., 2010), soit en favorisant son oligomérisation (Giustiniani et al., 2014).

IV. La glycation

La glycation, ou réaction de Maillard, est une réaction de glycosylation non-enzymatique des protéines fréquemment observée avec le vieillissement qui consiste en la formation d'une liaison entre la fonction amine primaire des lysines ou des arginines et la fonction aldéhyde des aldoses comme le glucose (Ansari et al., 2011). Il est à noter que Tau est une protéine particulièrement riche en lysines ce qui constitue un environnement chimique favorable à cette MPT. *In vitro*, l'incubation de Tau recombinante avec du glucose conduit à la glycation de douze sites dont sept sont localisés dans les domaines de liaison aux microtubules (Nacharaju et al., 1997) ce qui pourrait diminuer l'affinité de Tau pour les microtubules (Ledesma et al., 1994). *In situ*, l'existence des protéines Tau sous forme glyquée semble se limiter à un contexte pathologique puisque dans le cerveau humain, seules les protéines Tau pathologiques extraites de PHFs présentent une telle modification (Ledesma et al., 1995; Ko et al., 1999). Ainsi, ces protéines Tau glyquées pourraient être soit une signature biochimique, soit participer à la formation des PHFs en accélérant le processus de fibrillogénèse ou en stabilisant ces derniers (Ledesma et al., 1994; 1996; Necula and Kuret, 2004; Kuhla et al., 2007).

V. La nitration

A l'instar de la glycation, la nitration est elle aussi une MPT dont la fréquence augmente avec le vieillissement. Cette modification cible les résidus tyrosine et consiste en l'ajout d'un groupement nitro NO₂ pour former la 3-nitro tyrosine (Radi, 2013) (Figure 16A). De la même façon que la phosphorylation ou la glycation, la nitration de Tau a d'abord été découverte au sein de neurones en DNF suggérant son rôle dans l'agrégation de Tau (Horiguchi et al., 2003). De manière intéressante, il a été montré que Tau pouvait également être soumise à cette

modification pendant la différenciation neuronale suggérant donc un rôle physiologique de cette MPT (Cappelletti et al., 2004).

In vitro, la nitration des tyrosines médiée par l'ion peroxynitrique NO_3^- se produit préférentiellement sur les Tyr18 et 29, et de façon moins importante sur les Tyr197 et 394 (Reynolds et al., 2005a; 2006a). Le développement d'anticorps spécifiques de chacune des tyrosines modifiées a permis de valider l'existence de ces espèces *in situ* (Reynolds et al., 2005b; 2006b; Reyes et al., 2011; 2012). De manière intéressante, toutes les tyrosines ne sont pas affectées de la même façon selon un contexte physiologique ou pathologique (Figure 16B). Au niveau fonctionnel, la nitration de Tau entraînerait une diminution de sa capacité à polymériser les microtubules (Reynolds et al., 2006a) et faciliterait son oligomérisation *in vitro* et *in cellulo* (Zhang et al., 2005c). Ces résultats furent confirmés par la suite par injection bilatérale dans l'hippocampe d'un donneur d'ion peroxynitrique dans un modèle murin dans lequel une augmentation de la nitration de Tau est corrélée avec son hyperphosphorylation et l'apparition d'épitopes pathologiques (Zhang et al., 2006).

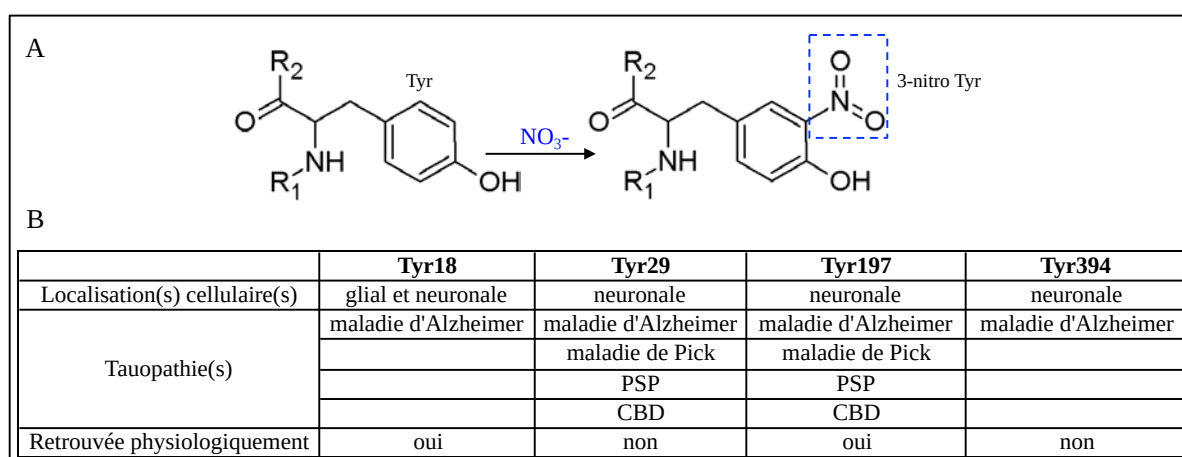


Figure 16 : Réaction de nitration d'une tyrosine par l'ion peroxynitrique et caractéristiques des tyrosines de Tau soumises à cette MPT. (A) Représentation de la réaction de nitration. (B) Les résidus Tyr18, 29, 197 et 394 sont sujets à cette MPT *in situ*, seule la 3-nitro Tyr18 est retrouvée à la fois dans les cellules neuronales et gliales dans la MA, les 3-nitro Tyr29 et 197 présentent les mêmes caractéristiques à l'exception de la présence de 3-nitro Tyr197 dans le tissu cérébral sain. La Tyr394 n'est retrouvée que dans la MA.

VI. La polyamination

La réaction de polyamination par les transglutamyloses (TGs) implique deux acides aminés : une glutamine comme groupement donneur, une lysine comme groupement accepteur. Cette réaction génère un peptide lié par un pont dit « γ -glutamyl- ϵ -lysine » et entraîne une liaison qui peut être inter ou intramoléculaire à l'instar des ponts disulfures (Wang et al., 2008)

(Figure 17). Ce type de pont formé par l'action des TGs est extrêmement stable et aboutit à la formation de complexes protéiques hautement insolubles et résistants à la plupart des détergents ou dégradations enzymatiques. Ces caractéristiques sont présentes au sein des PHF ce qui suggère que ces derniers pourraient être sujets à cette MPT. De plus, une surexpression des TGs est observée dans la MA (Citron et al., 2001) et les protéines Tau présentes dans les DNF sont co-localisées avec les TGs (Wilhelmus et al., 2009).

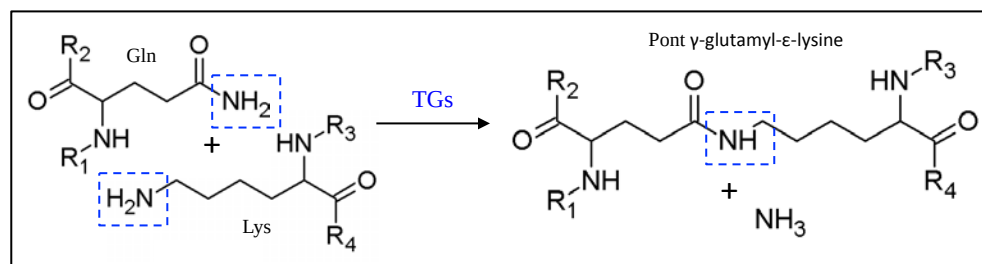


Figure 17 : Réaction de polyamination par les transglutaminases. Les TGs catalysent la formation d'un pont γ -glutamyl- ϵ -lysine à partir d'une lysine et d'une glutamine.

L'incubation de protéine Tau recombinante avec les TGs conduit à la formation de protéines cross-linkées et l'utilisation de la spectrométrie de masse a permis d'identifier huit sites accepteurs et dix sites donneurs (Murthy et al., 1998). *In situ*, la polyamination de Tau semble être un évènement précoce dans la formation de la DNF (Singer et al., 2002). En outre, dans un modèle murin de Tauopathie, les protéines Tau hyper-phosphorylées et cross-linkées sont présentes en abondance et seraient impliquées dans la formation des DNF (Halverson et al., 2005). En conclusion, ces travaux suggèrent une implication des TGs dans la formation des lésions histopathologiques de la MA.

VII. Acétylation et méthylation

L'acétylation et la méthylation sont également des MPTs récemment décrites comme impliquées dans la biologie et la physiopathologie de la protéine Tau. Elles réfèrent à une réaction qui introduit respectivement un groupement acétyle ou méthyle au niveau des lysines et sont catalysées par les lysines-acétyle/méthyle transférases (Figure 18). *In vitro*, l'incubation de Tau avec de l'acétyl-coenzyme A (donneur physiologique de groupement acétyle) et une lysine-acétyltransférase conduit à l'acétylation de Tau sur plus de vingt sites et l'utilisation d'outils immunologiques a permis de valider l'acétylation sur les résidus Lys163, 174 et 180

(Min et al., 2010). De la même façon, il a été montré que Tau était acétylée également sur la Lys280 dans la MA et dans d'autres Tauopathies telles que la dégénérescence cortico-basale et la PSP (Cohen et al., 2011a; Irwin et al., 2012). De façon intéressante, l'acétylation de Tau diminue son affinité pour les microtubules et favorise son agrégation (Cohen et al., 2011a). Parmi les enzymes impliquées dans la régulation de cette MPT, il semble que Sirt1, une histone désacétylase soit impliquée dans la désacétylation de Tau *in cellulo* (Min et al., 2010) et HDAC6 *in vivo* (Cook et al., 2014). A l'inverse, une autre étude montre que l'acétylation de Tau dans les motifs KXGS des domaines de motifs répétés empêche son agrégation en empêchant la phosphorylation de ces sites (Cook et al., 2014). Il apparaît donc que selon la lysine ciblée, les conséquences fonctionnelles seront différentes. De façon surprenante, il a été récemment découvert que le domaine de liaison aux microtubules de Tau pourrait avoir une activité acétyltransférase et donc acétyler Tau *in vitro* (Cohen et al., 2013). Cette découverte pourrait ouvrir de nouvelles pistes quant aux fonctions physiologiques de Tau.

En ce qui concerne la méthylation, il a été montré que Tau purifiée à partir de PHFs était sujette à cette modification au niveau de sept résidus lysines (Thomas et al., 2012). Très récemment, il a été mis en évidence que cette MPT pouvait avoir lieu physiologiquement puisqu'elle était retrouvée au sein de tissus sains. De plus, cette modification ne semble pas moduler la polymérisation des microtubules et semble avoir un effet anti-agrégateur (Funk et al., 2014). Ainsi, cette modification serait, à l'heure actuelle, la seule modification capable de défavoriser l'agrégation de Tau sans moduler son activité biologique principale.

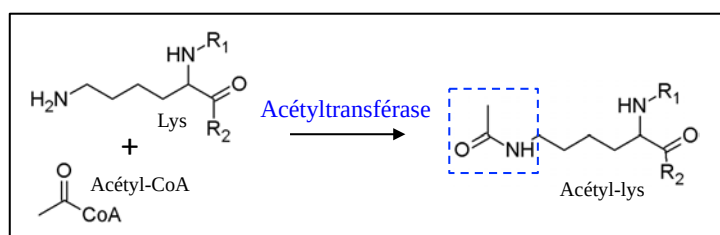


Figure 18 : Réaction d'acétylation par les acétyltransférases. L'acétyl-coenzyme A est le donneur universel du groupement acétyle et substrat des acétyltransférases qui catalysent la réaction sur les lysines des protéines.

VIII. Ubiquitylation

L'UPS pour « Ubiquitine-Proteasome System » est un mécanisme cellulaire majeur dans la dégradation des protéines intracellulaires qui élimine les protéines mépliées ou endommagées du cytoplasme et du noyau (Glickman and Ciechanover, 2002). Les substrats adressés à l'UPS sont covalamment liés via une lysine par une protéine de soixante-seize acides aminés : l'ubiquitine. Les protéines poly-ubiquitylées (plusieurs ubiquitines liées par une liaison

covalente sur la Lys68 de l'ubiquitine) sont prises en charge par le complexe 26S de l'UPS pour y être protéolysées: le protéasome.

Brièvement, l'ubiquitinylation est une MPT complexe dans sa mise en œuvre car elle requiert l'action successive de trois classes d'enzymes appelées E1 (recrute l'ubiquitine), E2 (transfère l'ubiquitine de E1 à E3) et E3 (greffe l'ubiquitine sur la protéine cible). Le protéasome consiste généralement en 3 complexes protéiques. Le premier est un cœur catalytique (20S) comportant vingt-huit sous-unités, quatorze α et quatorze β , et parmi ces vingt-huit sous-unités, deux possèdent une activité dite « caspase-like », deux une activité « trypsin-like et deux auront une activité « chymotrypsine-like ». A chaque extrémité du cœur catalytique, prennent place les deux autres complexes protéiques (19S) identiques impliqués dans la prise en charge des substrats poly-ubiquitylés, leur dés-ubiquitinylation et leur linéarisation ATP dépendante. Une fois linéarisées, les protéines sont dégradées par les trois activités enzymatiques en peptides de trois à vingt acides aminés (Figure 19).

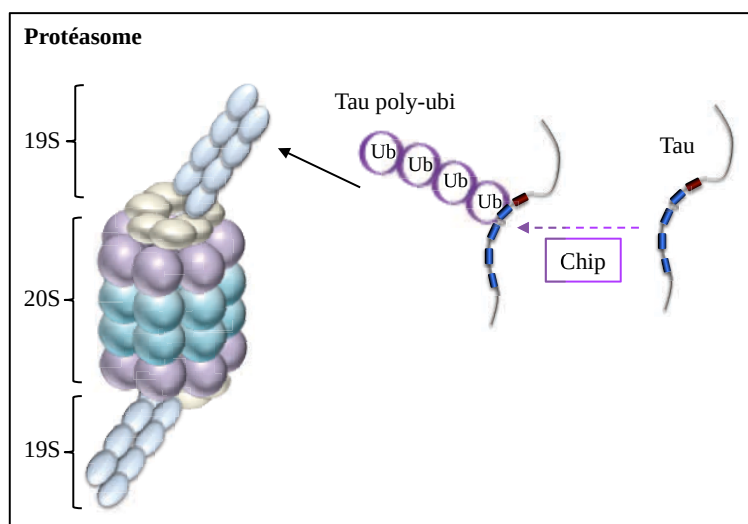


Figure 19 : Représentation schématique de la dégradation de Tau par l'UPS. Tau peut être poly-ubiquitylée par CHIP afin d'être prise en charge par le complexe 26S de l'UPS, le cœur catalytique (20S) et une particule régulatrice (19S). Tau pourrait être également mono-ubiquitylée ce qui favoriserait son agrégation sous forme de PHFs.

Les premiers indicateurs d'une liaison entre le protéasome et Tau dérivent de la fréquente co-localisation de PHFs avec l'ubiquitine (Mori et al., 1987; Perry et al., 1989). Les sites d'ubiquitinylation identifiés au sein de PHFs sont les Lys254, Lys257, Lys311 et Lys353, toutes localisées dans le domaine de liaison aux microtubules (Morishima-Kawashima et al., 1993; Cripps et al., 2006). De façon intrigante, certaines de ces lysines ont été retrouvées mono-ubiquitylées ce qui n'est pas favorable pour une dégradation par l'UPS (Thrower et al., 2000). En condition non pathologique, des extraits cérébraux de rats traités pharmacologiquement pour inhiber le protéasome présentent une accumulation de protéines Tau ubiquitylées (Zhang et al., 2005b; Liu et al., 2009b). Une évidence supplémentaire de

l'implication du protéasome dans la dégradation de Tau est venue de l'identification de l'ubiquitine ligase E3 CHIP dans l'ubiquitinylation de Tau *in cellulo* et *in vivo* (Petrucelli et al., 2004; Shimura et al., 2004).

Il faut noter que l'ubiquitinylation n'est pas la seule MPT impliquée dans la dégradation de Tau. En effet, selon les modèles d'étude et les sites, la phosphorylation de Tau serait un régulateur majeur de la dégradation de Tau. Plus récemment, il a été montré que l'acétylation de Tau pouvait également favoriser sa stabilité.

Pour clore ce second chapitre, une coopération entre les différentes MPTs semble être requise pour assurer l'intégrité fonctionnelle de Tau et une dérégulation des MPTs entraîne une perte(s) de fonction(s) de la protéine Tau, et un gain de fonction toxique. Conformément au nombre de sites déjà identifiés, la phosphorylation peut être considérée comme la MPT majeure (45 sites dans la MA), et son implication dans la biologie et la physiopathologie de Tau a été très largement étudiée.

En comparaison aux études portant sur la phosphorylation de Tau, il existe d'autres études, moins nombreuses, sur les autres MPT comme la glycation, la nitration ou encore la méthylation. Actuellement, nous n'avons aucune connaissance sur l'impact de ces MPT moins étudiées sur la localisation cellulaire de Tau et sur les conséquences cellulaires associées et des études supplémentaires sont nécessaires pour combler ces inconnues. La découverte de nouvelles MPT affectant Tau, l'acétylation étant la plus récente, permettra de mieux connaître la biologie et la physiopathologie de cette protéine.

Chapitre 3 : La troncation de la protéine Tau comme modification post-traductionnelle émergente

La troncation peut être définie comme une **protéolyse partielle** générant des intermédiaires protéiques. Cette modification post-traductionnelle engendre donc des fragments protéiques et ses conséquences fonctionnelles varient selon la protéine cible. Les acteurs à l'origine de cette MPT sont les protéases (ou peptidases) dont les fonctions varient de la maturation des protéines (Antoniak and Mackman, 2014) en passant par la digestion alimentaire (Mbikay et al., 2013), la cicatrisation et la coagulation sanguine (Douaiher et al., 2014) ou encore la plasticité synaptique (Sonderregger and Matsumoto-Miyai, 2014). A côté des protéases, un autre mécanisme est susceptible de générer des protéines tronquées, il s'agit de la présence d'un site alternatif de la traduction comme c'est le cas par exemple pour le facteur de transcription P53 (Solomon et al., 2014).

I. La troncation de Tau dans la maladie d'Alzheimer et les Tauopathies

L'intérêt pour cette modification post-traductionnelle dans le cadre de la MA a émergé suite à la découverte de la présence de formes tronquées de Tau au sein des PHFs isolés de cerveaux ou au sein de liquide cébrospinal de patients atteints de la MA. Ceci suggère l'implication de la troncation dans les mécanismes qui sous-tendent la pathologie Tau mais également son potentiel rôle dans la génération de biomarqueurs de la pathologie (Wang et al., 2010a). Plus tardivement, des sites de clivage d'autres fragments de troncation de Tau ont été découverts au sein d'autres Tauopathies telles que la PSP ou la DCB. Actuellement, aucune étude n'a réellement démontré l'existence de cette modification en conditions physiologiques.

I.A Les fragments de troncation de Tau identifiés dans la MA

La caractérisation des protéines Tau par électrophorèse monodimensionnelle indique, qu'en plus des isoformes de protéines Tau hyper- et anormalement-phosphorylées et des agrégats, il existe tout un ensemble de produits de protéolyse de Tau déléetée de sa partie amino- et/ou carboxy-terminale au sein des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Kovacech and Novak, 2010) (Watanabe et al., 1999; Zilka et al., 2012). Parmi l'ensemble

complexe de ces formes tronquées, **deux espèces principales** ont été partiellement identifiées au niveau carboxy-terminal : **une forme tronquée se terminant au résidu glutamate 391** désignée par Glu391 et **une forme tronquée se terminant au résidu aspartate 421** désignée par Asp421 (numérotation basée sur l'isoforme de Tau 2N4R).

I.A.1 Historique de la troncation de Tau et découverte d'un fragment au cœur des agrégats : le fragment Glu391

La découverte d'un fragment de troncation de Tau dans le tissu cérébral humain par Claude Wischik et Michal Novak en 1988 (Wischik et al., 1988) n'était pas le premier objectif de leur recherche. A l'époque, même si Tau semblait être le principal constituant des PHF, il était clair que les PHFs étaient une hétérogénéité protéique composée en partie de protéines Tau, de neurofilaments et d'inclusions de protéines poly-ubiquitinylées (Roher et al., 1988). L'idée d'une telle hétérogénéité demeurait dans le fait que pendant le processus de formation des PHFs, ceux-ci pouvaient piéger de nombreuses protéines cytosoliques non directement impliquées dans le processus d'agrégation des protéines Tau. Cette hypothèse suggérait donc que Tau pourrait être une signature biochimique des PHFs sans en être le principal constituant ni même jouer un rôle dans la formation de ces derniers. Les travaux de Novak et de Wischik étaient donc centrés sur l'identité protéique propre aux PHFs et sur leur caractérisation ultrastructurale afin de déterminer l'élément responsable de la formation des PHFs. Pour déterminer cet élément, ils avaient mis au point un protocole basé sur une digestion enzymatique des PHFs à la pronase permettant de se séparer des protéines présentes à l'extérieur des PHFs et de ne conserver que le « *PHF core* » résistant à la pronase (Wischik and Novak, 1988; Wischik et al., 1988). La caractérisation par migration sur gel de poly-acrylamide de ce « *PHF core* » révéla plusieurs espèces migrant entre 10 et 20 kDa. Le séquençage d'Edman des bandes majoritaires du cœur PHF a permis d'isoler la séquence peptidique de quelques acides aminés servant de matrice pour générer des sondes oligonucléotidiques afin d'analyser une banque d'ADNc extraits de tissu cérébral humain. Le screening de cette banque a conduit à l'identification de l'ADNc du « *PHF core* » comme étant celui de Tau (Goedert et al., 1988) ce qui a permis de conclure que la séquence peptidique (VQIVYKP) retrouvée dans le « *PHF core* » et utilisée pour cette analyse est localisée dans le troisième domaine de liaison aux microtubules de Tau ([Figure 20](#)).

Afin de mieux caractériser ce « *PHF core* » et d'en identifier précisément la composition en protéines Tau, un anticorps monoclonal, le mAB423, a été développé par la même équipe.

L'utilisation de cet anticorps en microscopie électronique permet de détecter les PHFs digérés à la pronase à de très faibles concentrations d'utilisation mais également les PHFs natifs à de plus fortes concentrations. De manière intéressante, l'utilisation d'autres anticorps marquant les PHFs natifs ne permet pas de détecter le « *PHF core* » résistant à la pronase même à de plus fortes concentrations. Ces résultats indiquent que l'épitope mis en évidence par le mAB423 est d'une part différent de celui mis en évidence par des sérums classiques anti-Tau, et d'autre part qu'il n'est pas lié uniquement à la digestion à la pronase puisqu'il est retrouvé dans des PHFs natifs (Wischik et al., 1988). Connaissant la région approximative de Tau reconnue par le mAB423 (le troisième domaine de liaison au microtubules), les auteurs de ces travaux et d'autres équipes (Ksiezak-Reding and Yen, 1991) proposèrent un modèle de distribution de Tau au sein des PHFs : le cœur des PHFs serait composé en partie des domaines de liaisons aux microtubules de Tau comprenant notamment le peptide VQIVYKP et la partie externe des PHFs serait constituée de protéines Tau présentant d'autres domaines non reconnus par le mAB423, probablement la moitié amino-terminale de Tau et son extrémité carboxy-terminale (Figure 20).

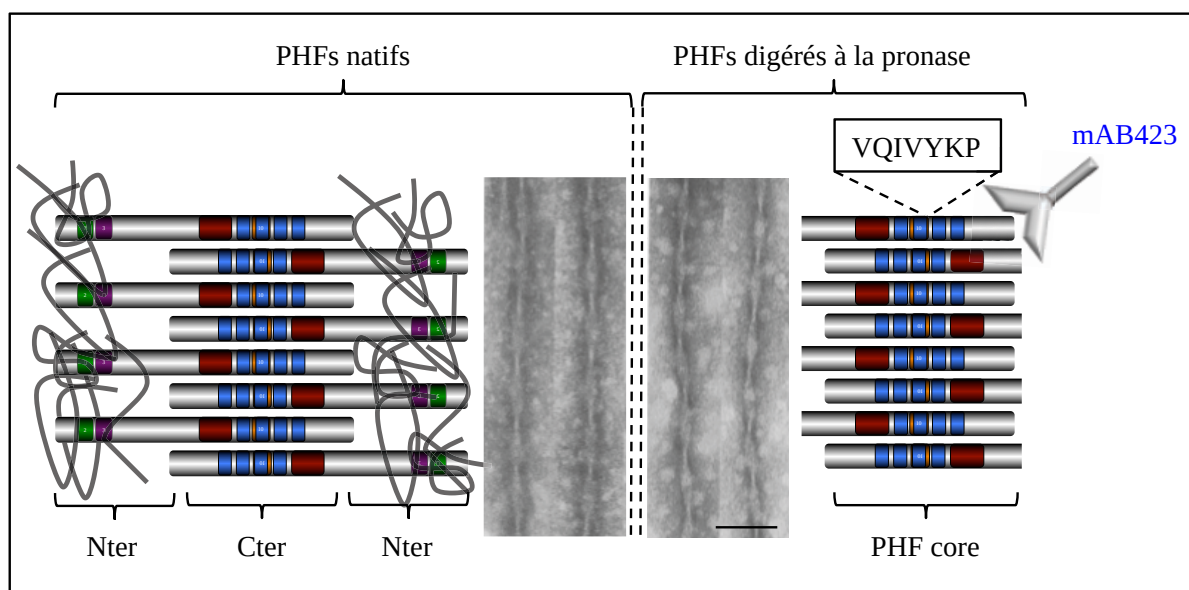


Figure 20: Représentation schématique et caractérisation ultrastructurale de PHFs natifs ou digérés par la pronase. La surface des PHFs (Paired Helical Filaments) se compose du domaine amino-terminal de Tau et d'une multitude de protéines (neurofilaments, protéines polyubiquitinylées). Cette hétérogénéité protéique se reflète en microscopie électronique par un « manteau flou » digérable par la pronase. La digestion enzymatique permet de mettre en évidence un épitope de Tau reconnu par l'anticorps mAB423 constitutif du cœur des PHFs. Figures de microscopie électronique tirées de (Wisichik et al., 1988). Echelle : 100nm.

La présence d'un fragment de protéolyse de Tau au sein des PHFs fut définitivement validée en caractérisant leur « *PHF core* » et surtout, en déterminant l'épitope précis reconnu par le

mAB423. Des travaux supplémentaires démontrèrent que le « *PHF core* » était en fait composé à la fois des domaines R1 R2 R3 et R2 R3 R4 des isoformes 4R de Tau, et des domaines R1 R3 R4 des isoformes 3R de Tau (Jakes et al., 1991). De plus, l'immuno-réactivité de l'anticorps mAB423 vis-à-vis du « *PHF core* » est inchangée suite à un traitement à la phosphatase alcaline suggérant que l'épitope reconnu par le mAB423 est soit non phosphorylé, soit non accessible à la phosphatase alcaline (Novak et al., 1991). L'identification précise de l'épitope reconnu par le mAB423 fut possible en clonant, dans des vecteurs d'expression, des séquences d'ADN codantes pour différentes régions de la protéine Tau, comprenant notamment les régions codantes pour les domaines de liaison aux microtubules, chaque séquence débutant et se terminant par des extrémités 5' et 3' différentes. Une fois clonées, ces séquences furent traduites dans un système procaryote, purifiées et analysées en western-blot en utilisant l'anticorps mAB423 comme anticorps primaire. Les résultats démontrèrent que seules les séquences **se terminant par le résidu glutamate 391** furent détectées par l'anticorps mAB423 (Novak et al., 1993) (numérotation des acides aminés basée sur l'isoforme la plus longue). L'ensemble de ces travaux fut la base de la découverte d'un fragment de troncation de Tau au sein du tissu cérébral de patients atteints de la MA.

I.A.2 Le fragment de Tau se terminant par le résidu Asp421

La présence de marqueurs d'activité apoptotique au sein de neurones en dégénérescence neurofibrillaire suggérait que l'apoptose pourrait être l'un des mécanismes impliqués dans l'étiopathologie de la MA (Thompson, 1995; Ugolini et al., 1997; Dickson, 2004). Dans ce contexte, des études ont été entreprises afin de décortiquer l'effet de l'apoptose sur Tau et les microtubules dans un modèle de culture primaire de cervelet de rat (Canu et al., 1998). Les travaux montrèrent que, dans ce modèle, Tau serait un substrat des caspases ou des calpaïnes en condition apoptotique, générant un fragment de troncation de Tau d'une masse moléculaire apparente d'environ 17 kDa, incapable de se lier aux microtubules. Une étude ultérieure basée sur un modèle de culture de neurones corticaux de rat traités avec des fibrilles de peptides A β pour induire l'activation des caspases a validé ces résultats et a déterminé qu'une des protéases impliquées dans la génération de ce fragment était la caspase 3 (Gamblin et al., 2003b). La connaissance de la séquence consensus de cette protéase (DXXD) et du profil électrophorétique du fragment généré par la protéolyse a permis la prédiction du site carboxy-terminal de ce fragment comme étant le **résidu aspartate 421**. Le développement d'un anticorps spécifique (l'anticorps TauC3) de cette espèce tronquée confirma que le clivage en aspartate 421 se

produisait *in cellulo* et de manière plus importante au sein du tissu cérébral provenant de patients atteints de la MA (Gamblin et al., 2003b). En plus de l'anticorps TauC3, un second anticorps a été développé en parallèle par une autre équipe, l'anticorps α - Δ Tau, qui reconnaît également le fragment de Tau clivé en aspartate 421. Son utilisation dans des modèles murins de Tauopathies ou au sein de tissus cérébraux de patients atteints de la MA confirma l'existence de ce fragment *in vivo* (Rissman et al., 2004).

I.A.3 Les autres fragments de Tau générés par des activités caspases

En outre de l'Asp421, d'autres sites de clivage sont générés par des activités caspases. Un criblage immunologique d'extraits protéiques et de coupes histologiques de tissus cérébraux a permis de mettre en évidence qu'il existe, au sein des agrégats insolubles de Tau, une multitude d'espèces affichant différents épitopes qui nécessitent des clivages à la fois amino- et carboxy-terminaux pour être révélés (Dickson et al., 1992; Endoh et al., 1993; Bondareff et al., 1994; García-Sierra et al., 2003). Il existerait ainsi différentes populations de DNF et les plus tardives d'entre elles présenteraient une perte de l'extrémité amino-terminale de Tau (Horowitz et al., 2004). Cette perte de l'extrémité amino-terminale est corrélée avec la présence du site Asp421, site de clivage généré par la caspase-3, suggérant l'implication d'activités caspases dans la génération de ces espèces délétées de leurs extrémités amino- et carboxy-terminales. Or, il a été montré *in vitro* que la perte d'extrémité amino-terminale de Tau est liée à un clivage en Asp13 par la caspase 6 (Horowitz et al., 2004). Néanmoins, ce site de clivage n'a jamais pu être mis en évidence *in vivo*. Une autre étude indique un site de troncation par la caspase 3 au niveau du résidu Asp25 *in vitro* et également au sein du tissu cérébral de patients atteints de la MA (Rohn et al., 2002).

En plus du résidu Asp13, la caspase 6 serait également impliquée dans la génération d'un fragment de la protéine Tau tronquée en carboxy-terminal au résidu Asp402 (Guo et al., 2004). Le développement d'un anticorps spécifique de ce site de clivage a permis de valider son existence *in situ* et cette espèce ne serait retrouvée qu'au sein de tissus cérébraux de patients atteints de la MA dans des neurones en DNF (Guo et al., 2004). De plus, une étude plus récente a étayé l'implication de ce fragment comme marqueur de la MA dans le liquide cébrospinal (Ramcharitar et al., 2013).

I.A.4 Les fragments indépendants de protéolyses enzymatiques

Dans l'engouement pour comprendre les mécanismes de formation des PHF, des analyses comparatives par spectrométrie de masse des protéines Tau solubles et agrégées ont été entreprises. Parmi ces analyses, il a été montré par Watanabe et ses collaborateurs que certains résidus asparagine étaient retrouvés modifiés en iso-aspartates au sein de PHF (Watanabe et al., 1999). Cette modification consiste dans un premier temps en une déamidation puis en une hydrolyse du groupement intermédiaire succinimide. Cette MPT est l'une des caractéristiques des protéines vieillissantes (Figure 21) (Aswad et al., 2000).

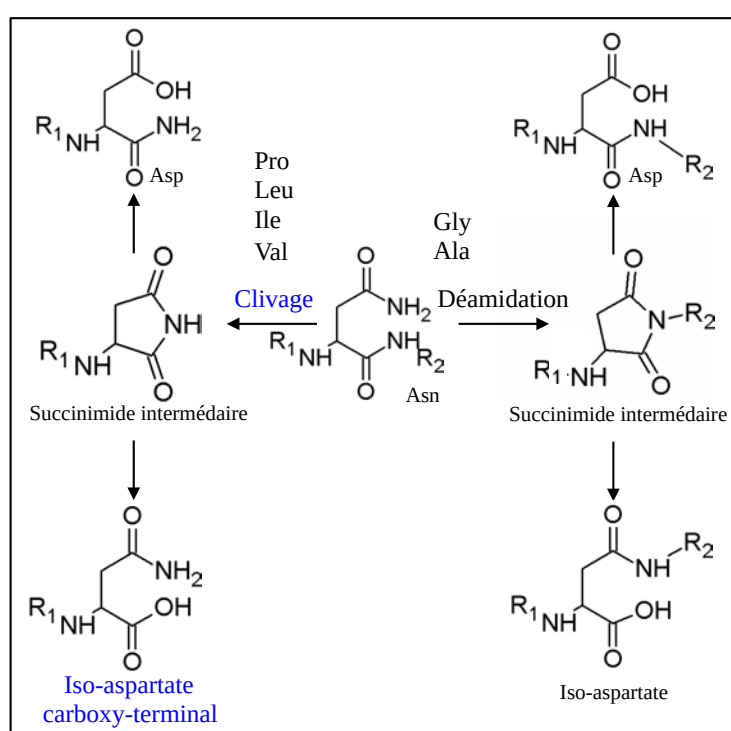


Figure 21 : Mécanisme de formation des résidus iso-aspartates proposés en 2004 par Watanabe et ses collaborateurs. En fonction de la longueur de la chaîne latérale de l'acide aminé qui la suit, l'asparagine peut être déamidée ou clivée par un mécanisme indépendant de toute protéolyse. Dans les deux cas, un groupement succinimide intermédiaire est formé et les produits finaux seront un résidu acide aspartique ou un résidu iso-aspartate localisés soit dans la chaîne peptidique (dans le cas d'une déamidation) soit à l'extrémité carboxy-terminale (dans le cas du clivage).

Il apparaît en fait que cette modification se produit lorsque l'acide aminé voisin de l'asparagine cible présente une chaîne latérale de petite taille. Or, la même équipe publia quelques années plus tard que le même type de résidus iso-aspartates étaient présents à la proximité d'acides aminés possédant une chaîne latérale importante (Leu, Ile, Val) *in situ* ou *in vitro* dans des conditions démunies de toute activité protéolytique (Watanabe et al., 2004). Les résidus sujets à cette MPT au sein des PHFs sont les Asp255, Asp265, Asp296 et Asp327,

toutes localisées dans le domaine de liaison aux microtubules. Le mécanisme proposé pour expliquer cette modification serait que les résidus précédant ces asparagines sont sujets à une protéolyse indépendante de toutes activités enzymatiques conduisant à la formation du groupement succinimide et à l'iso-aspartate.

I.A.5 Le fragment se terminant par le résidu Asn358 : un site récemment découvert

Une étude récente a démontré que Tau était clivée *in vitro* par une protéase lysosomiale au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de deux résidus: les Asn255 et Asn358. De façon importante, la génération d'un outil immunologique spécifique d'un fragment de Tau se terminant en Asn358 a permis de mettre en évidence que ce site de clivage était détecté au sein de tissus cérébraux de patients atteints de la MA (Zhang et al., 2014).

I.B La troncation de Tau dans les autres Tauopathies

Les études sur la troncation de Tau sont principalement réalisées dans le cadre de la MA et peu de travaux se sont intéressés à l'impact de cette modification dans d'autres Tauopathies. Il demeure néanmoins des différences de profil de troncation de Tau en fonction des Tauopathies ce qui pourrait susciter l'intérêt d'étudier cette MPT au sein des Tauopathies non-Alzheimer (Hanger and Wray, 2010). Dans le cadre de la PSP et de la DCB qui appartiennent aux Tauopathies de classe II (isoformes 4R retrouvées au sein des agrégats), l'accumulation de Tau hyper-phosphorylée se produit au sein des neurones et des cellules gliales, mais la distribution cérébrale des lésions et la morphologie des agrégats sont différentes (Kouri et al., 2011). De façon intéressante, des travaux basés sur le séquençage peptidiques de fragments isolés par électrophorèse ont révélé l'existence d'un fragment carboxy-terminal dans des fractions insolubles caractéristiques de la DCB débutant en Thr169 et d'un fragment retrouvé uniquement dans la PSP commençant en Glu187 (Arai et al., 2004). Ceci illustre l'importance de l'identification des fragments de troncation quant à leur rôle potentiel comme outil de diagnostic complémentaire de la neuropathologie.

Quelques études basées sur des criblages immuno-histologiques se sont intéressées à la présence des deux fragments majeurs de la MA, les fragments Glu391 et Asp421, au sein de tissus cérébraux de patients atteints de Tauopathies. Les résultats montrent que ces fragments sont tous les deux retrouvés dans la maladie de Pick dans laquelle l'agrégation de Tau ne se manifeste non pas par des DNF mais par des corps de Pick (Guillozet-Bongaarts et al., 2007;

Mondragón-Rodríguez et al., 2008).

Enfin, un dernier fragment d'une masse moléculaire apparente de 17 kDa est présent au sein de tissus cérébraux de patients atteints de la MA et de nombreuses Tauopathies (PSP, DCB, maladie de Pick, démence pugilistique...) (Ferreira and Bigio, 2011). Une première cartographie immunologique et l'implication des calpaïnes dans la génération d'un fragment de même masse moléculaire *in cellulo* a facilité l'établissement d'une fenêtre comprise entre les résidus Glu45-Arg230 (Park and Ferreira, 2005). Une étude plus récente publiée par l'équipe des Mandelkow a permis de définitivement confirmer la présence de ce fragment au sein d'un modèle cellulaire et de façon plus importante, dans le tissu cérébral humain. Le développement d'outils immunologiques a révélé que ce fragment de 17kDa est clivé en amino-terminal en Ala125 et carboxy-terminal en Arg230 *in cellulo*. Parmi ces deux sites, seul le dernier a été retrouvé, **non systématiquement**, chez certains individus indépendamment de tout critère anatomopathologique (Garg et al., 2011). Ces derniers résultats suggèrent donc l'existence d'un site de clivage de la protéine Tau en conditions physiologiques, mais aucune donnée supplémentaire vis-à-vis de ce site de clivage n'est disponible actuellement.

I.C Fragments de Tau dans le liquide cérébro-spinal

Le liquide cérébro-spinal (LCS) est le fluide biologique dans lequel baignent le cerveau et la moelle spinale. Ce liquide protège le SNC d'éventuels chocs et des infections qui pourraient l'endommager. Sa composition est proche de celle du plasma (liquide constitutif du sang) et elle est censée refléter l'état physiopathologique du cerveau en cas d'inflammation ou d'infection (Zappaterra and Lehtinen, 2012). Dans la MA, le LCS fait l'objet de nombreuses investigations puisque des bio-marqueurs de la pathologie s'y retrouvent parmi lesquels les espèces d'A β ₄₂, de protéines Tau totales et phosphorylées (Blennow et al., 2012).

En ce qui concerne les protéines Tau dans le LCS, en 1997, leur caractérisation biochimique a révélé qu'au sein de ce fluide biologique de patients atteints de la MA, ces espèces sont tronquées à l'inverse des protéines Tau retrouvées chez des individus sains (Johnson et al., 1997). En fait, il apparaît que ce sont majoritairement des fragments amino-terminaux de Tau qui sont retrouvés au sein du LCS en quantité plus importante chez les patients atteints de la MA (Johnson et al., 1997; Meredith et al., 2013; Amadoro et al., 2014). Parmi les sites de clivage identifiés dans le tissu cérébral, seul l'Asp402 généré par la caspase 6 semble avoir été récemment validé (Ramcharitar et al., 2013). De façon intéressante, les profils électrophorétiques de ces fragments purifiés à partir de LCS sont différents selon les

Tauopathies ce qui illustre l'importance de ces fragments dans le diagnostic différentiel des Tauopathies (Borroni et al., 2008; Borroni et al., 2009; Wagshal et al., 2014).

En résumé, deux fragments principaux, les fragments présentant les résidus Glu391 et Asp421 en carboxy-terminal, et quelques fragments secondaires ont été identifiés à partir de tissus cérébraux de patients atteints de la MA et d'autres Tauopathies. L'identification de plus d'une dizaine de formes tronquées (Figure 22) soulève quelques questions : quelles sont les significations biologiques de ces fragments ? Sont-ils impliqués directement dans les processus physiopathologiques des Tauopathies en participant au processus de formation des différentes lésions neuropathologiques ? Sont-ils une simple signature biochimique de ces pathologies, et dans ce cas, peuvent-ils participer à un diagnostic différentiel efficace ? Ces fragments dérivent-ils d'une protéolyse de la protéine Tau soluble ou sont-ils des produits de dégradation d'agrégats de Tau ? Quelles sont les conséquences fonctionnelles de la troncation de Tau ?

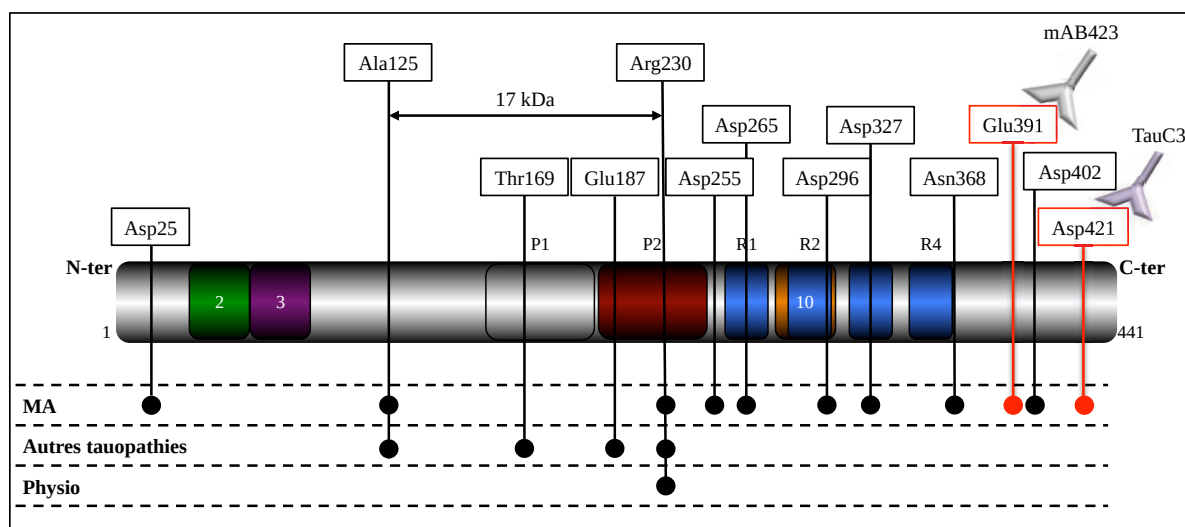


Figure 22 : Distribution des sites de clivage identifiés à partir du tissu cérébral humain de patients atteints de la MA ou d'autres Tauopathies. Les anticorps mAB423 et TauC3 permettent de détecter respectivement les fragments se terminant par les résidus Glu391 et Asp421, les deux sites carboxy-terminaux majeurs identifiés dans la MA et validés dans plusieurs études. En outre de ces deux sites, l'Asp25, l'Asn368 et l'Asp402 sont également retrouvés dans la MA tout comme les sites de clivage indépendants de protéolyse identifiés par Watanabe et ses collaborateurs (Asp255, Asp265, Asp296 et Asp327). En ce qui concerne les autres Tauopathies, les sites de clivage Thr169 et Glu187 semblent être spécifiques respectivement de la DCB et de la PSP. Enfin, un fragment de 17 kDa commençant en Ala125 et se terminant en Arg230 serait présent *in situ* physiologiquement (physio) et dans les Tauopathies.

Des études fonctionnelles ont permis d'apporter quelques éléments de réponses à ces questions; elles sont soit basées principalement sur les espèces Glu391 et Asp421 dans des modèles cellulaires ou murins, soit basées sur l'utilisation d'autres constructions de fragment

non retrouvés dans le tissu cérébral.

II. Les conséquences fonctionnelles de la troncation sur Tau

Ainsi, il existe plus d'une dizaine de sites de clivage identifiés sur Tau, systématiquement, dans des conditions pathologiques. Nous pouvons logiquement nous attendre à ce que les conséquences fonctionnelles de la troncation sur Tau varient en fonction de la région affectée. De façon générale, les études fonctionnelles qui portent sur la troncation mettent en évidence que les fragments présentent des modifications conformationnelles qui conduisent à **un gain de fonction toxique** supportant ainsi la rôle de la troncation comme potentialisateur de la l'agrégation de Tau. Néanmoins, des études de caractérisations immunologiques des DNF révèlent que l'ordre d'apparition des événements de troncation et d'agrégation n'est pas toujours clair. De plus, de nombreuses études réalisées dans les modèles cellulaires et murins s'avèrent assez contradictoires quant aux conséquences cellulaires de la surexpression des fragments de Tau dans ces modèles.

Comment la troncation de Tau pourrait elle conduire à un gain de fonction toxique ?

Dans le cadre des études s'intéressant aux propriétés physico-chimiques de la protéine Tau, il a été montré que Tau possédait des motifs pro-agrégatifs appelés « PHF6 et PHF6* » au niveau de sa partie carboxy-terminale, localisés au niveau des domaines répétés R2 et R3 (Bergen et al., 2000; Bergen et al., 2001). La séquence peptidique de ces motifs ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ (PHF6*) et ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ (PHF6) se prête à la formation de structures secondaires de type feuillets β (Mukrash et al., 2005). Ce type de structure est une caractéristique commune aux protéines à pouvoir fibrillogénique (Soto 2003; Tyedmers et al., 2010). Dans les conditions physiologiques et lorsque Tau n'est pas liée aux microtubules, ces motifs pro-agrégatifs seraient masqués par le domaine de projection qui recouvre la partie carboxy-terminale de la protéine (modèle du trombone). Compte tenu de sa composition en acides aminés -la glycine, la lysine, la proline, la sérine et la thréonine représentent la moitié du contenu en acides aminés-, Tau à son état natif est une protéine très soluble non conformée et sensible aux protéases (Mandelkow et al, 2007). La troncation de Tau au niveau de quelques acides aminés amino-terminaux et/ou carboxy-terminaux serait suffisante pour démasquer les motifs PHF6 et PHF6* pro-agrégatifs. Les fragments ainsi générés contenant ces motifs serviraient alors d'agents de nucléation dans les processus d'oligomérisation et d'agrégation de Tau ([Figure 23](#)).

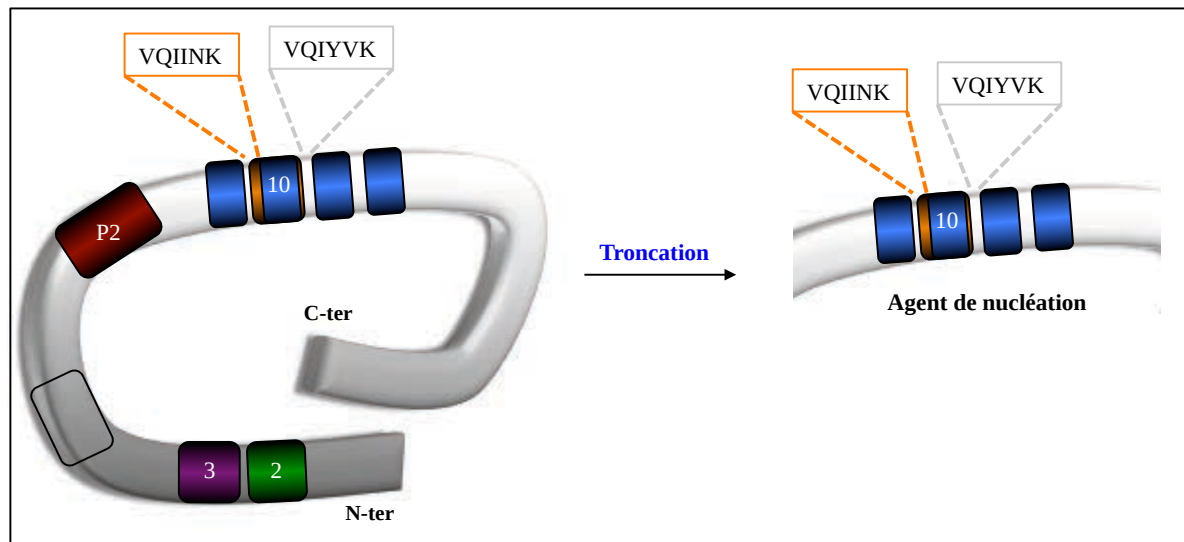


Figure 23 : Modèle de démasquage des séquences pro-agrégatives de Tau par la troncation. Le domaine de projection recouvre le domaine carboxy-terminal contenant les séquences pro-agrégatives VQIINK et VQIYVK de Tau. La troncation de Tau serait l'un des mécanismes par lequel ces séquences naturellement masquées au sein de la protéine Tau entière se retrouvent démasquées. Les fragments contenant ces séquences serviraient alors d'agent de nucléation.

Le rôle de la troncation dans l'initiation de la fibrillogénèse de Tau est étayé par un certain nombre d'études *in vitro* dans lesquelles des protéines Tau tronquées recombinantes ont été utilisées. Les résultats montrent que les fragments démunis de leur partie carboxy-terminale mais contenant les répétitions R2 et R3 possèdent un gain de fonction qui affecte la vitesse de fibrillogénèse et catalysent la formation d'oligomères de la protéine Tau intacte (Abraha et al., 2000; Gamblin et al., 2003a; Yin and Kuret, 2006). En plus de démasquer les domaines pro-agrégatifs, la troncation carboxy-terminale de Tau permettrait de libérer la queue carboxy-terminale qui présente des propriétés anti-agrégatives (Berry et al., 2003). Les fragments de troncation pourraient donc servir d'agent de nucléation et catalyseraient l'agrégation de la protéine Tau entière. Ces observations *in vitro* suggèrent donc que la troncation conduirait à la formation des DNF observées au sein du tissu cérébral humain. Néanmoins plusieurs travaux axés sur l'adoption de conformation pathologique et l'agrégation de Tau au sein de tissus cérébraux s'avèrent contradictoires. En effet, il est difficile d'établir une véritable cinétique d'apparition des MPT de Tau dans le processus de formation de la DNF. **L'une des questions qui se pose est de déterminer si la troncation de la protéine Tau soluble est antérieure ou ultérieure aux modifications conformationnelles et à la formation de la DNF.**

De nombreuses cartographies immunologiques de la distribution tissulaire des fragments Glu391 et Asp421 réalisées sur le tissu cérébral indiquent que ces fragments de troncation apparaissent dans un ordre particulier pendant la maturation de la DNF. Selon Binder et ses

collaborateurs, le premier évènement dans la formation de protéines Tau pathologiques conduisant à la formation de la DNF serait un changement conformationnel de Tau qui se traduit par l'apparition de l'épitope Alz50 (interaction des acides aminés 5-9 avec les résidus 313-322). S'en suivrait alors l'apparition des épitopes TauC3 (clivage en 421) et mAB423 (clivage en 391) traduisant des évènements de troncation carboxy-terminale (Binder et al., 2005; Guillozet-Bongaarts et al., 2005). Une observation similaire a été faite après l'analyse des DNFs au sein d'un modèle murin transgénique qui surexprime une protéine Tau portant une mutation de type DFTP-17 (Delobel et al., 2008). Les auteurs montrèrent que l'apparition du fragment Asp421 est ultérieure à celle d'un épitope de phosphorylation anormale et à la présence de DNF et concluent donc que la troncation en Asp421 est bien ultérieure à la formation de cette lésion. Ces derniers résultats doivent être pris en compte avec précaution car les mutations DFTP-17, qui ont une pénétrance de 100% chez les individus les portant, altèrent la conformation de Tau et favorisent son hyperphosphorylation (Alonso et al., 2004), or dans la MA, aucune mutation du gène MAPT n'est encore décrite. Par ailleurs, une autre étude a montré que le clivage de Tau en Asp421 est à l'origine d'un changement conformationnel lui-même marqueur d'une DNF très précoce (Rissman et al., 2004). Similairement, des dépôts anormaux intracellulaires de Tau contiennent des fragments tronqués en 391 sans présenter de marquage positif pour la thioflavine (marqueur de DNF), démontrant l'importance du fragment dans la mutation de la DNF (Mena et al., 1996). Enfin, des criblages immunohistologiques sur tissus cérébraux ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la densité de DNF présentant les fragments Glu391 et Asp421 et les stades de Braak. La troncation du résidu Glu391 serait principalement détectée dans le cortex transentorhinal alors que le fragment Asp421 serait plutôt localisé au niveau hippocampique (Bondareff et al., 1994; García-Sierra et al., 2001; Basurto-Islas et al., 2008). Ces travaux soulèvent l'hypothèse qu'il existerait une sensibilité d'une population neuronale à présenter un fragment particulier plutôt qu'un autre.

Ainsi, malgré le nombre d'études réalisées à partir de tissus cérébraux humains, il est difficile d'établir la cinétique précise d'apparition de ces fragments de troncation, notamment les fragments se terminant par les résidus Asp421 et Glu391. Le développement de modèles de surexpression de fragment a permis d'étayer les études fonctionnelles sur ces fragments.

La génération de modèles murins a définitivement permis de consolider l'importance de la troncation de Tau comme catalyseur de la pathologie Tau et de son agrégation. Le premier modèle développé fut celui de Novak et de ses collaborateurs (Zilka et al., 2006). Il s'agit d'un

modèle de rat surexprimant un fragment tronqué en amino- et carboxy-terminal (151-391) et reproduisant les caractéristiques immunohistologiques (formation évolutive de DNF) et biochimiques (hyper- et phosphorylation anormale, accumulation progressive de matériel insoluble) observées dans la MA. Ces animaux présentent des troubles de la mémoire spatiale liés aux lésions hippocampiques et corticales sans altération motrice notable (Hrnkova et al., 2007) ainsi qu'une activation de la microglie concomitante à l'apparition des DNFs (Zilka et al., 2009). Un autre modèle murin a été généré à partir du fragment se terminant au résidu Glu391 mais présentant la totalité de l'extrémité amino-terminale (1-391). De la même façon, ces animaux présentent une hyper- et une phosphorylation anormale de Tau, des conformations pathologiques et une accumulation d'agrégats insolubles (McMillan et al., 2011). En ce qui concerne le clivage sur l'Asp421, un seul modèle a été développé chez la souris par injection d'adénovirus codant pour la séquence 1-421 (de Calignon et al., 2010). De manière importante, cette étude a prouvé que la présence de cette espèce était suffisante pour conduire à la formation d'agrégats protéiques positifs pour la thioflavine.

En outre de favoriser la fibrillogénèse et d'entraîner l'apparition de DNF dans les modèles murins, la troncation de Tau, lorsqu'elle est étudiée dans un contexte cellulaire, conduirait à mort cellulaire. La plupart des études mécanistiques sur la troncation de Tau dans les modèles cellulaires se basent sur l'utilisation des deux sites de clivage majeurs identifiés dans la MA, le Glu391 et l'Asp421. La surexpression dans des cellules de neuroblastome humain de la forme tronquée 1-421 conduit à une augmentation de marqueurs apoptotiques deux jours après transfection (Chung et al., 2001; Matthews-Roberson et al., 2008). De la même façon, une surexpression transitoire dans des cellules COS ou dans des cultures primaires de formes tronquées allant de 151-391 à 151-421 engendre une fragmentation de l'ADN (Fasulo et al., 2000; 2005).

Dans d'autres modèles d'étude, une activation de caspases et de calpaïnes est induite par un traitement du milieu de culture avec des fibrilles d'A β (Troy et al., 2000; Gamblin et al., 2003b), induisant la formation d'espèces de Tau tronquées et l'apoptose. Ainsi, une des hypothèses proposée pour expliquer la mort neuronale observée dans la MA fut la suivante : l'accumulation et l'agrégation d'A β au niveau synaptique permettrait d'activer des protéases cytosoliques telles que les caspases et les calpaïnes. Ces dernières génèreraient des fragments de Tau capables 1) de servir d'agent de nucléation et donc de point de départ pour former des PHFs au sein du neurone, 2) d'activer à leur tour des caspases afin de conduire à l'apoptose créant ainsi un cercle vicieux. Les modèles murins de surexpression des fragments précédemment développés présentent effectivement des DNFs, mais aucune mort neuronale par

apoptose n'est observée. Un autre modèle murin démontre que la surexpression de Tau conduit à une activation transitoire de caspases, et que cette activation précède premièrement, l'apparition du site Asp421, et deuxièmement, la formation d'une DNF qui reste présente dans le neurone pendant plusieurs mois sans activation détectable de caspases (de Calignon et al., 2010). Ces résultats remettent donc en question l'hypothèse de la mort neuronale par apoptose précédemment décrite. Ceci a également été soulevé dans un autre modèle cellulaire de neuroblastomes humains, dans lequel la surexpression du fragment 151-391 conduit à une mort cellulaire sans activation notoire de caspase ou de marqueur d'activité apoptotique (Zilkova et al., 2011).

Pour conclure, les études portant sur les conséquences fonctionnelles de la troncation abordées principalement par l'utilisation des fragments majeures de la MA, les fragments se terminant par les résidus Glu391 et Asp421, démontrent que la troncation de Tau, au niveau de ces résidus, conduit à un gain de fonction toxique. Même si les études réalisées sur des tissus cérébraux humains sont nombreuses, la cinétique d'apparition de la troncation, plus précisément de ces deux espèces, dans la maturation de la DNF, n'est pas encore claire.

III. Les protagonistes de la troncation de Tau

III.A Généralités sur les protéases

Les enzymes qui hydrolysent une liaison peptide sont divisées en deux groupes fonctionnels : les exoprotéases qui hydrolysent la liaison peptique aux extrémités amino- ou carboxy-terminales (amino- et carboxy-peptidases), et à l'inverse, les endoprotéases qui hydrolysent la liaison peptidique à l'intérieure de la chaîne peptidique. Les exo- et endoprotéases sont des hydrolases capables donc de rompre une liaison peptidique. Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour les protéases ce qui a permis de les regrouper en famille mécanistique en fonction de la nature de l'acide aminé ou du site actif impliqué dans la catalyse de la réaction ([Tableau 3](#)). A l'heure actuelle, il existerait plus de deux mille quatre cent protéases tout organisme confondu (d'après la banque de donnée MEROPS (Rawlings et al., 2013))

	Protéases à Sérine	Protéases à Cystéine	Protéases à Aspartate	Métalloprotéases
Mécanisme	Triade catalytique Sérine, Histidine, Aspartate	Triade catalytique Cystéine, Histidine, Aspartate	Deux aspartates dans le site catalytique	Interaction ionique du Zinc
Exemples	Trypsine	Papaïne	Sécrétases (β)	Méthionine-aminopeptidase
	Chymotrypsine	Caspases	Cathepsines (D,E)	Métalloprotéases matricielles
	Cathepsine G	Calpaines		Collagénase
	Thrombine	Cathepsines		
	Elastase			

Tableau 3 : Classification des quatre classes majeures de protéases. D'un point de vue moléculaire, les protéases à sérine sont caractérisées par une triade catalytique au sein de leur site actif composée de résidus histidine, aspartate et sérine. Cette classe de protéases est représentée par la trypsine, la thrombine, la plasmine, la neuropsine ou la neurotrypsine. La seconde classe des protéases sont les protéases à cystéine, très majoritairement représentées par les caspases et les calpaines, régulateurs principaux de l'apoptose. Les protéases à aspartate constituent la troisième classe des protéases. Généralement activées à pH acide, elles sont représentées par certaines cathepsines ainsi que la pepsine ou encore les rénines. Les métalloprotéases constituent la quatrième classe et elles sont caractérisées par la présence d'un ion bivalent comme le zinc au sein de leur site catalytique stabilisé par des interactions ioniques avec trois histidines. Dans cette famille sont retrouvées entre autres les collagénases, la matrilysine et les gélatinase. Elles sont impliquées dans la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire.

III.B Les protéases impliquées dans la troncation de Tau

De par son état naturellement non conformé, Tau est sensible à la dégradation par les protéases et plusieurs études se sont intéressées aux protéases impliquées dans la génération de ces fragments de troncation (Hanger and Wray, 2010; Wang et al., 2010a).

III.B.1 Tau substrat des caspases

Les caspases (cysteinyl aspartate specific protease) appartiennent à la famille des protéases à cystéine et sont principalement connues pour jouer un rôle central dans la mort cellulaire programmée : l'apoptose. Chez les mammifères, il existe une douzaine de caspases et toutes sont activées par la protéolyse d'un zymogène ou pro-caspase (Nicholson, 1999; Shi, 2002). Une séquence consensus de type P4-P3-P2-P1 avec un résidu Asp en P4 et P1 gouverne le clivage par les caspases. Les résidus P3 et P2 étant extrêmement variables, la séquence consensus fiable se résume à DXXD.

Comme il a été cité précédemment, les caspases sont capables de cliver Tau à de multiples sites amino- et carboxy-terminaux. *In vitro*, Tau est clivée par les caspases 1, 3, 6, 7 et 8 (Gamblin et al., 2003b; Rissman et al., 2004). Le site Asp421 peut être généré par les caspases 3, 7 et 8 ce qui conduit à un fragment de Tau plus petit de 5 kDa comparé à la protéine Tau entière intacte (Rissman et al., 2004). Toujours *in vitro*, Tau est clivée par la caspase 6 en Asp13, ce site n'a pas encore été mis en évidence *in situ* bien qu'une colocalisation fréquente

de caspase 6 avec les DNFs soit observée (Guo et al., 2004). Enfin, deux autres résidus, Asp25 et Asp402 identifiés *in situ*, sont également générés par les caspases 3 et 6 respectivement.

III.B.2 Tau substrat des calpaïnes

Les calpaïnes pour « *calcium dependant thiol proteinases* » sont des endoprotéases cytoplasmiques appartenant à la famille des protéases à cystéine responsables de la « protéolyse neutre calcium dépendante » (Baudry et al., 2013). Actuellement, une quinzaine de calpaïnes sont identifiées chez l'Homme parmi lesquelles, les calpaïnes 1 et 2 sont majoritaires au niveau cérébral. Dans la MA, une activation des calpaïnes avant l'apparition des premières lésions et une colocalisation fréquente de certaines calpaïnes activées et la DNF sont observées (Saito et al., 1993; Grynspan et al., 1997). Un fragment de 124 acides aminés et d'une masse moléculaire apparente de 17 kDa est présent au sein d'extraits cérébraux de patients atteints de la MA et d'autres Tauopathies, et le niveau d'expression de ce fragment est corrélé avec l'activité des calpaïnes chez ces patients (Park and Ferreira, 2005; Ferreira and Bigio, 2011). Des études cellulaires ont d'ailleurs prouvé que la génération de ce fragments était calpaïne-dépendante après activation de ces dernières par un traitement des milieux de cultures avec des fibrilles d'A β (Park and Ferreira, 2005).

De façon plus générale, les calpaïnes jouent un rôle important dans les processus de dégénérescence neuronale médiée par Tau. En effet, l'extinction génique des calpaïnes dans un modèle drosophilidien surexprimant une protéine Tau mutée DFTP-17 permet de diminuer la dégénérescence rétinienne (Reinecke et al., 2011). De la même façon, la surexpression de la calpastatine, inhibiteur protéique physiologique des calpaïnes, dans un modèle murin de Tauopathie, permet de diminuer la phosphorylation et la troncation de Tau, son agrégation et *in fine*, les déficits comportementaux liés à la mort neuronale (Rao et al., 2014).

III.B.3 Tau substrat des protéases lysosomiales

Les cathepsines (il en existe une vingtaine chez l'homme) sont les protéases principales du lysosome et sont répertoriées dans les protéases à cystéine à exception des cathepsines A et G qui sont des protéases à sérine et des cathepsines D et E qui sont des protéases à aspartate. Parmi ces enzymes, la cathepsine D semble jouer un rôle majeur dans la MA puisqu'elle est, d'une part, co-localisée avec les DNFs (Cataldo and Nixon, 1990; Cataldo et al., 1991; 1994), et d'autre part, impliquée dans la troncation de Tau *in vitro* et *in cellulo* (Kenessey et al., 1997).

De plus, dans la MA et dans d'autres Tauopathies comme la maladie de Niemann-Pick de type C (Tauopathie caractérisée par des mutations dans les gènes codant pour des protéines endosomiales et lysosomiales impliquées dans le transport intracellulaire du cholestérol), des anomalies lysosomiales et endosomiales sont observées (Cataldo et al., 1997; Jin et al., 2004; Vanier, 2010). Ces anomalies pourraient être liées à l'augmentation de l'activité de la cathepsine D observée dans ces pathologies.

Par ailleurs, une protéase lysosomiale de la famille des protéases à cystéine, la « *legumain* » ou encore AEP pour « *Asparaginyl endopeptidase* », a été récemment montrée comme étant à l'origine de la génération du site de clivage Asn368 dans la MA (Zhang et al., 2014). Cette protéase serait également impliquée dans la génération d'un fragment de Tau terminant en Asn255 *in vitro*, mais l'existence de ce site n'a pas encore été validée chez l'Homme (Zhang et al., 2014). Dans la MA, l'AEP serait suractivée et délocalisée vers le compartiment cytoplasmique, ce qui pourrait expliquer l'origine du site Asn368 (Basurto-Islas et al., 2013).

III.B.4 Autres protéases

Enfin, d'autres travaux utilisant des systèmes acellulaires suggèrent que des protéases comme la PSA pour « *Puromycin-Sensitive Aminopeptidase* », la trypsine ou le protéasome pourrait générer des fragments de Tau mais l'existence de telles espèces au sein de tissus cérébraux humains reste encore à confirmer et les fonctions biologiques ou physiopathologiques des fragments générés restent encore à déterminer (Wang et al., 2010a).

IV. La troncation, un mécanisme commun dans l'étiologie des protéinopathies ?

Les protéinopathies sont des pathologies caractérisées par la présence de lésions intra- ou extracellulaires composées de protéines pathologiques, mal pliées ou intrinsèquement désordonnées et agrégées et non éliminées par les systèmes de dégradation cellulaires. Généralement, ces maladies affectent le système nerveux de façon progressive au cours de leur évolution et elles sont caractérisées par une perte de population neuronale spécifique reflétant les différents tableaux cliniques observés chez les patients. Les protéines qui constituent les agrégats protéiques dans ces pathologies sont : Tau dans les Tauopathies, Tau et le peptide amyloïde A β dans la MA, l' α -synucléine dans les Synucléinopathies (Narkiewicz et al., 2014), la protéine TDP-43 pour « *Transactive Response DNA Binding Protein* » dans les démences

fronto-temporales (DFT) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Cohen et al., 2011b), la huntingtin dans la maladie de Huntington (Zheng and Diamond, 2012) ou encore les protéines à expansions de poly-glutamine dans les maladies éponymes (Ravache et al., 2010). De façon intéressante, des fragments de troncation des protéines impliqués dans ces protéinopathies sont retrouvés dans les agrégats ce qui suggère que la troncation pourrait être l'un des mécanismes communs à ces protéinopathies (Jadhav et al., 2013).

IV.A Troncation de l' α -synucléine

L'agrégation de l' α -synucléine est la signature d'un groupe de pathologies neurodégénératives regroupées sous le terme de Synucléinopathies incluant la maladie de Parkinson, les démences à corps de Lévy ou encore l'atrophie multi-systématisée (Dickson, 2012). L' α -synucléine est une petite protéine de cent quarante acides aminés, non conformée, exprimée au niveau neuronale et préférentiellement localisée au sein des terminaisons pré-synaptiques (Zhang et al., 2008) (Figure 24). La fonction précise de l' α -synucléine n'est pas encore déterminée, néanmoins, plusieurs travaux suggèrent que cette protéine est impliquée dans la synthèse, la libération et la capture d'un neurotransmetteur : la dopamine (Baptista et al., 2003; Yavich et al., 2004; Fountaine and Wade-Martins, 2007).

La caractérisation biochimique des agrégats insolubles d' α -synucléine a permis de mettre en évidence que quinze pourcents de cette protéine étaient présents sous forme tronquée dans les agrégats intraneuronaux (Baba et al., 1998; Campbell et al., 2001; Liu et al., 2005a). La présence d'au moins trois de sites de clivage carboxy-terminaux a été démontrée au sein de tissus cérébraux de patients, il s'agit des résidus Asp119, Pro120 et Tyr133 (Li et al., 2005; Anderson et al., 2006). Il a été démontré que ces fragments de troncation, à l'inverse de la protéine entière, présentent une structure secondaire de type feuillets- β et qu'ils augmentent l'assemblage des fibrilles de synucléine et encouragent la synucléine entière à s'agréger (Serpell et al., 2000; Murray et al., 2003; Ulusoy et al., 2010). De plus, des modèles murins de surexpression de la forme tronquée terminée par le résidu Pro120 présentent une hypersensibilité au stress et une déplétion en dopamine (Michell et al., 2007; Daher et al., 2009). Les mécanismes impliqués dans la formation de ces espèces tronquées ne sont pas encore connus mais des études *in vitro* et dans des modèles cellulaires démontrent que des fragments de synucléine peuvent être générés par le protéasome et la voie lysosomiale ainsi que d'autres protéases comme les calpaïnes, la neurosine, la MMP3 ou encore la caspase-3 (Beyer and Ariza, 2013).

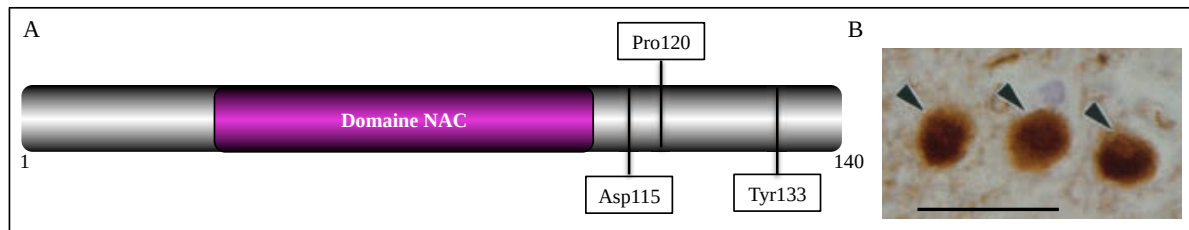


Figure 24 : Représentation schématique de l'α-synucléine, de ses sites de troncation et observation de corps de Lewy. (A) L'α-synucléine est une protéine de 140 acides aminés, constituée d'un domaine NAC pour « *Non Amyloid Component* » et présentant trois sites de clivage identifiés *in situ* : l'Asp115, la Pro120 et la Tyr133. (B) Immuno-marquage de l'α-synucléine dans le cortex d'un patient atteint de la maladie de Parkinson. Photo tirée de (Baba et al., 1998). Echelle : 30 μm.

IV.B Troncation des protéines impliquées dans les maladies par expansions de poly-glutamine

Les maladies par expansions de poly-glutamine (MEP) sont constituées d'une petite dizaine de maladies neurodégénératives héréditaires incluant entre autres la maladie de Huntington et les ataxies spino-cérébelleuses (ASC) (Ravache et al., 2010). Ces pathologies sont causées par un mécanisme mutationnel particulier. Il s'agit d'une expansion du tri-nucléotide CAG (codon nucléotidique codant pour la glutamine) répétée en tandem dans la région des gènes mutés. Cette expansion poly-glutamine, lorsqu'elle dépasse un certain seuil physiologique, confère un gain de fonction toxique et entraîne l'agrégation des protéines mutées (Perutz et al., 1994). Plus la taille de l'expression est longue, plus la maladie se déclare tôt et plus les symptômes sont sévères (Andrew et al., 1993).

Le gène touché par l'expansion poly-glutamine dans la maladie de Huntington est le gène codant pour la huntingtine. Cette protéine est une protéine massive de trois mille cent quatorze acides aminés exprimée ubiquitairement, avec un niveau d'expression majeur dans le cerveau (DiFiglia et al., 1995). En condition physiologique, cette protéine est cytoplasmique. Dans la maladie de Huntington, cette protéine est localisée au niveau nucléaire spécialement sous forme **de fragments amino-terminaux** contenant les expansions de poly-glutamine. De plus, dans la pathologie, elle est le principal constituant des inclusions nucléaires (DiFiglia et al., 1997; Becher et al., 1998; Landles et al., 2010) (Figure 25).

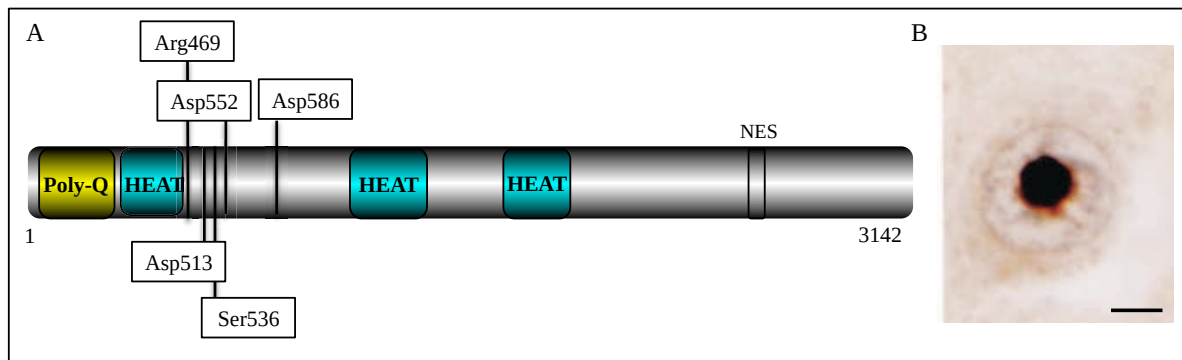


Figure 25 : Représentation schématique de l'huntingtine, de ses sites de clivage et observation immuno-histochimique d'une inclusion nucléaire d'huntingtine. (A) La huntingtine est une protéine massive de 3142 acides aminés composée de plusieurs domaines HEAT. Dans la maladie de Huntington, cette protéine présente une extension de poly-glutamine en amino-terminale, ce qui conduit à la formation d'inclusion nucléaire au sein des neurones. (B) Marquage immuno-histologique de la huntingtine au sein d'un neurone cortical d'un patient atteint de la maladie de Huntington. Photo tirée de (Becher et al., 1998). Echelle : 5 µm.

Au niveau mécanistique, les caspases 2, 3 et 6 sont impliquées et génèrent des coupures protéolytiques en Asp513, Asp552 et Asp586 *in vitro* et *in vivo* (Wellington et al., 2000; 2002; Hermel et al., 2004; Warby et al., 2008). La génération de fragments contenant les expansions de poly-glutamine serait toxique conduisant à la sur-activation des caspases menant d'une part, à la production de plus de fragments, et d'autre part, à une mort neuronale créant ainsi un cercle vicieux (Wellington and Hayden, 2000). De façon intéressante, la surexpression de l'huntingtine mutée résistante à un clivage induit par la caspase 6 au niveau du résidu Asp586 prévient de la mort neuronale et de dysfonctionnements moteurs en comparaison à son homologue non muté (Graham et al., 2006). En outre des caspases, certaines calpaïnes sont également impliquées dans la troncation de la huntingtine sur les résidus Arg469, Ser536, Asp586 (Gafni and Ellerby, 2002; Gafni et al., 2004). L'utilisation de mutants empêchant un clivage par les calpaïnes diminue la toxicité et l'agrégation (Gafni et al., 2004).

A côté de la huntingtine, d'autres protéines impliquées dans d'autres MEP sont présentes au sein des agrégats intracellulaires sous formes tronquées. Parmi ces protéines, nous pouvons citer les ataxines 3 et 7 impliquées respectivement dans les ASC 3 et 7 ou encore le récepteur des androgènes dans l'amyotrophie spino-bulbaire ou maladie de Kennedy (Ravache et al., 2010; Ehrnhoefer et al., 2011). Les protéines tronquées contenant les séquences poly-glutamine présentent toutes des meplissements et une tendance à s'agréger. Toutes ces protéines sont substrats de différentes caspases, et l'inhibition des caspases ou l'utilisation de mutants résistants à la protéolyse par les caspases ont démontré des effets bénéfiques dans les modèles utilisés.

IV.C Troncation de TDP-43

TDP-43 est une protéine de quatre cent quatorze acides aminés ubiquitairement exprimée et constituée de deux domaines de liaison aux ARNs et d'un domaine carboxy-terminal riche en glycines (Cohen et al., 2011b) (Figure 26A).

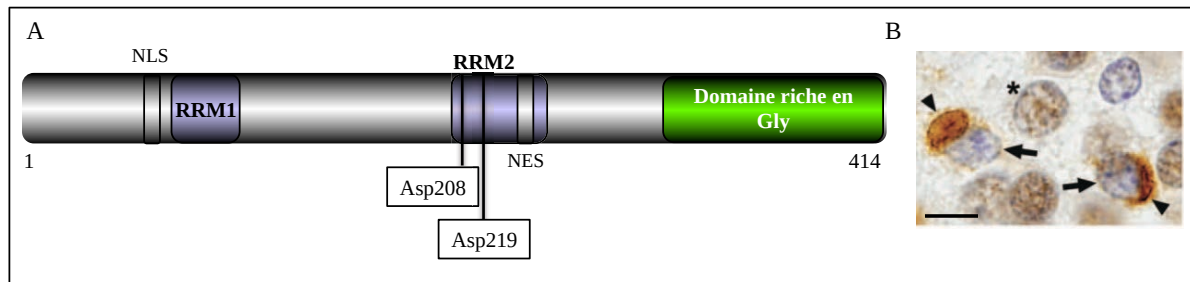


Figure 26 : Représentation schématique de la protéine TDP-43, de la distribution de ses sites de clivage et observation immuno-histochimique d'inclusions cytoplasmiques de TDP-43. (A) TDP-43 est une protéine de 414 acides aminés présentant deux domaines RRM pour « *RNA Recognition Motif* », une séquence d'import nucléaire NLS, une séquence d'export nucléaire NES et un domaine riche en glycines. La troncation de TDP-43 dans le domaine RRM2 engendre des fragments carboxy-terminaux démunis de séquences NLS et favorise la formation d'agrégats cytoplasmiques. (B) Marquage immuno-histologique d'inclusions cytoplasmiques avec un anticorps dirigé contre TDP-43. Photo tirée de (Igaz et al., 2008). Echelle : 7 µM.

Ces deux domaines RRM pour « *RNA Recognition Motif* » sont directement impliqués dans la fonction la plus étudiée de TDP-43 : la régulation des ARNm que ce soit au niveau de leur épissage ou leur localisation cellulaire. Récemment, il a été montré que des protéines TDP-43 pathologiques étaient retrouvées dans des agrégats cytoplasmiques insolubles dans des neurones ou des cellules gliales de patients atteints de FTD ou de sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Neumann et al., 2006; Tan et al., 2007) (Figure 26B). De plus, de nombreuses mutations (localisées dans la région codante pour le domaine carboxy-terminal riche en glycines) sont liées à des formes autosomales dominantes de SLA ou de FTD ce qui démontrent l'implication de TDP-43 dans l'étiopathologie de ces maladies.

L'intérêt de la troncation de ces pathologies est lié aux travaux d'Igaz et ses collaborateurs qui identifièrent des fragments carboxy-terminaux de TDP-43 comme composants majeurs de ses agrégats (Igaz et al., 2008). Actuellement, deux sites de clivage sont identifiés chez l'Homme, il s'agit des résidus Asp208 et Asp219. En outre, la surexpression de forme tronquées de TDP-43 débutant soit en Asp208 soit en Asp219 dans des modèles cellulaires conduit à la formation d'agrégats insolubles cytoplasmiques (Igaz et al., 2009; Zhang et al., 2009). De la même façon, des constructions de fragments carboxy-terminaux non identifiés

chez l'Homme de TDP-43 surexprimées dans des modèles de neuroblastomes humains engendrent la formation d'inclusions cytoplasmiques contenant à la fois les formes tronquées exogènes et la forme entière endogène (Nonaka et al., 2009). Ces résultats mettent donc en avant que la génération de fragments carboxy-terminaux contenant le domaine riche en glycines mène à la formation d'agrégats cytosoliques de TDP-43.

Tous ces travaux mettent en évidence le rôle crucial de la troncation dans ces pathologies neurodégénératives. Cette MPT tendrait à favoriser la formation d'agrégats intracellulaires ou extracellulaires en induisant des modifications conformationnelles et mènerait indubitablement à une perte des fonctions physiologiques des protéines modifiées. La transition de ces protéines solubles et fonctionnelles en agrégats semble être l'une des étapes clés dans les perturbations neuronales liées à ces protéinopathies (Jadhav et al., 2013) ([Figure 27](#)).

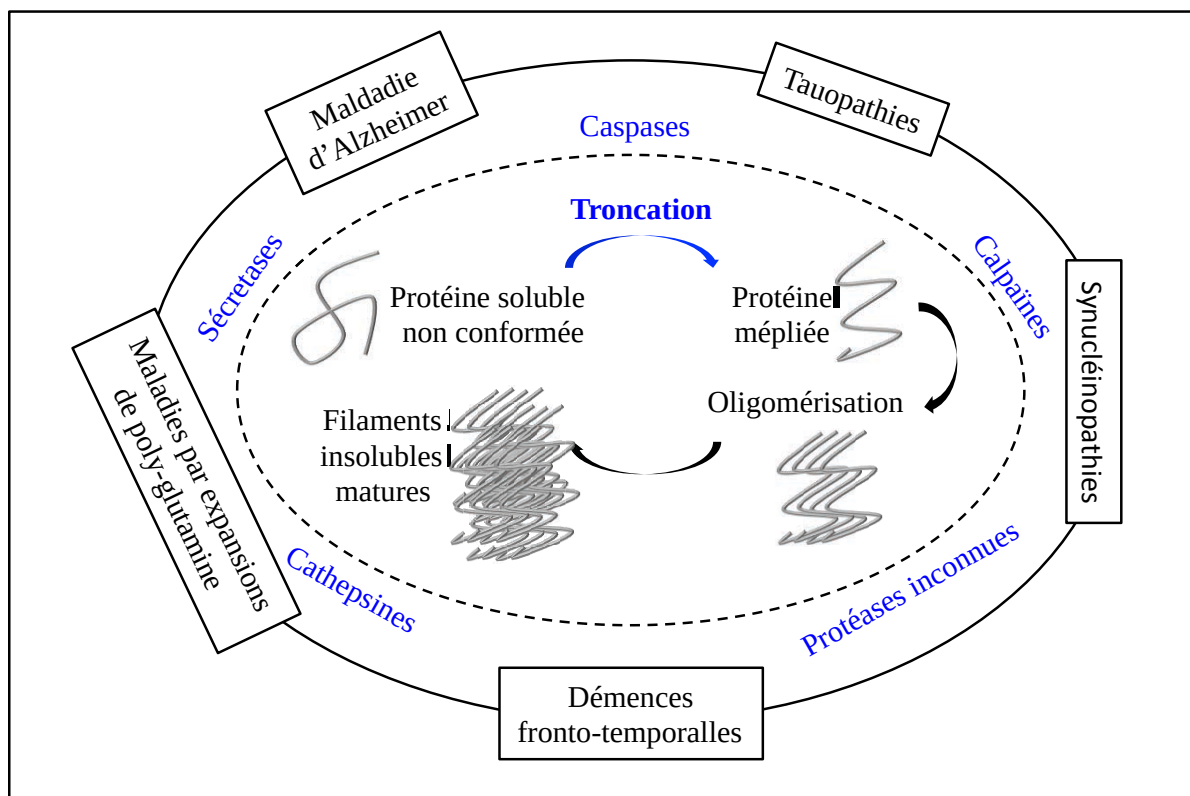


Figure 27 : Le cycle de la troncation dans les protéinopathies. Ce modèle représente des caractéristiques communes des différentes protéinopathies : la troncation serait à l'origine du mepliment des protéines favorisant leur oligomérisation et la formation de filaments insolubles à terme. Mécanistiquement, une forte implication des caspases et des calpaïnes est à retenir dans ces protéinopathies. Figure adaptée de (Jadhav et al., 2013).

*Afin d'assurer leur(s) fonction(s) au sein de la cellule, les protéines doivent atteindre leur conformation définitive. Ceci est mis en place par un réseau cellulaire, l'**homéostasie protéique**. Ce réseau comprend diverses voies conservées de réponse au stress qui contrôlent la synthèse protéique, la mise en conformation des protéines, leur localisation et leur dégradation (Calamini and Morimoto, 2012). L'accumulation de protéines mépliées, agrégées, et non éliminées par les systèmes de dégradation, dans les protéinopathies pourrait être le reflet d'une dérégulation de ce réseau.*

Les travaux précédents démontrent, d'une part, la présence de fragments de troncation au sein des agrégats constituant les lésions cérébrales observées dans les protéinopathies. D'autre part, la surexpression de ces fragments dans des modèles conduit à la formation de la lésion observée dans le tissu cérébral. Déterminer la place de la troncation, et, de façon plus générale, celle des MPT anormales affectant ces protéines, au sein de cette homéostasie protéique, constitue une étape essentielle pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces pathologies.

Objectifs de la thèse

Le laboratoire dans lequel ce travail de thèse s'inscrit s'intéresse aux Tauopathies, terme désignant un ensemble de pathologies neurodégénératives représentées entre autres par la maladie d'Alzheimer et caractérisées par **l'agrégation d'une protéine anormalement modifiée** : la protéine Tau. Tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules, majoritairement exprimée au niveau neuronal. Sa principale fonction, et de ce fait, la plus étudiée, consiste à réguler la dynamique d'une structure cytosquelettique nécessaire au fonctionnement et à l'intégrité des neurones: les microtubules. Bien que les mécanismes précis conduisant à l'agrégation de cette protéine Tau demeurent à déterminer, il apparaît qu'une dérégulation des modifications post-traductionnelles participe aux processus physiopathologiques des Tauopathies. Parmi les modifications post-traductionnelles impliquées, la troncation qui consiste en une protéolyse partielle générant des fragments protéiques, serait un protagoniste majeur.

En effet, de nombreux travaux mettent en évidence l'existence de fragments de Tau tronqués en amino- et carboxy-terminal au sein de tissus cérébraux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. De plus, d'autres études ont mis en évidence leur importance et leur pertinence biologique, que ce soit au niveau de leur participation dans l'agrégation de Tau et la formation de lésions caractéristiques des Tauopathies dans les modèles d'étude ou au niveau diagnostique de par leur présence au sein de liquide cébrospinal. Néanmoins, parmi la multitude de fragments présents au sein de tissus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de Tauopathies, seules les extrémités carboxy-terminales de deux fragments majeurs sont identifiées. De ce fait, la plupart des études fonctionnelles sur la troncation de Tau se basent sur l'utilisation de ces deux sites de clivage et se cantonnent à un contexte pathologique. L'identification de ces nombreux sites de clivage constitue l'une des étapes clés pour générer des outils moléculaires afin d'étudier le rôle de la troncation dans la biologie et la physiopathologie de Tau.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse qui vise dans un premier temps à **identifier des nouveaux sites de clivage de Tau chez l'Homme**, spécialement l'**extrémité amino-terminale des fragments générés**, moins caractérisée que leur extrémité carboxy-terminale dans la littérature. Pour identifier de nouveaux sites de clivage de la protéine Tau chez l'Homme, nous avons développé une approche protéomique. L'ensemble des mises au point de cette approche a été effectué avec un modèle cellulaire présentant des fragments de troncation de Tau. Une fois les conditions optimales établies, la même approche a été appliquée sur le tissu cérébral humain.

L'identification de nouveaux sites de clivage constitue un prérequis pour le second objectif de cette thèse qui consiste à développer des outils moléculaires afin de conduire des études fonctionnelles. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à **l'effet de la surexpression de la protéine Tau entière et de quatre de ses fragments identifiés**, au sein d'un modèle cellulaire de neuroblastome murin, vis-à-vis de **la régulation de la dynamique microtubulaire**.

Matériels & Méthodes

Matériels

I. Tissu cérébral humain

Les échantillons cérébraux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et d'individus sains proviennent de la collection Lille NeuroBank du Centre de Ressources Biologiques du CHRU de LILLE. La Lille NeuroBank 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 4](#)).

A	Cas	Neuropathologie (DNF)	Age	Délai PM (h)
	A	Braak 0	22	24
	B	Braak 0	41	11
	C	Braak 0	49	34
	D	Braak 0	52	28
	E	Braak 0	53	28
	F	Braak 0	61	20
	G	Braak II	75	20
	H	Braak IV	78	18
	I	Braak V	62	10
	J	Braak V	73	15
	K	Braak VI	57	23
	L	Braak VI	56	26

B	Cas	Neuropathologie (DNF)	Cortex	Age	Délai PM (h)
	1	Braak O	Frontal	22	24
			Occipital		
	2	Braak O	Occipital	26	Non renseigné
	3	Braak III	Frontal	82	48
			Occipital		
	4	Braak III	Frontal	76	10
			Occipital		
			Pariétal		
			Temporal		
	5	Braak VI	Frontal	56	26
			Occipital		

Tableau 4 : Tableaux présentant l'ensemble des tissus cérébraux humains utilisés pendant cette étude. (A) Tableau présentant l'ensemble des tissus cérébraux présentés pour la caractérisation par WB du profil de troncation de Tau. (B) Tableau présentant l'ensemble des tissus cérébraux utilisés pour les expériences de LC-MS/MS. Ces échantillons ont également fait l'objet d'une caractérisation systématique (résultats non montrés dans ce manuscrit).

Il s'agit d'échantillons de cortex temporaux, pariétaux, occipitaux et frontaux de patients atteints de la MA à différents stades de la maladie. Les stades évolutifs de la pathologie Tau sont établis par des neuropathologistes (Dr Maurage et Dr Deramecourt) selon la classification de Braak et Braak basée sur des analyses histologiques (Braak et al., 2011).

II. La lignée murine THY-Tau22

Le modèle murin THY-Tau22, développé au sein du laboratoire, surexprime sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1.2, l'isoforme 1N4R de la protéine Tau humaine portant les mutations G272V et P301S, mutations retrouvées dans les DFTP-17. Cette lignée de souris transgéniques présente notamment une pathologie Tau dans l'hippocampe, une région cérébrale importante dans le processus de mémorisation atteinte dans les stades précoces de la maladie d'Alzheimer (Schindowski et al., 2006; Van der Jeugd et al., 2013). Dans ce modèle, le niveau de pathologie Tau hippocampique est ainsi corrélé au déclin cognitif. Les souris, de fond génétique 100% C57Bl6/J 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 contrôles (WT). Des hippocampes d'une cinétique de souris THY-Tau22 et de souris sauvages, âgées de 3, 7 et 12 mois ont été utilisés dans cette étude. L'ensemble des protocoles développés a fait l'objet d'un avis favorable du comité d'éthique Nord-Pas-de-Calais.

III. Lignées cellulaires

III.A SH-SY5Y

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. Ces cellules possèdent un phénotype épithélial et peuvent être différenciées en cellules de type neuronal présentant des prolongements neuritiques après traitement au NGF (*Nerve Growth Factor*). **Cette lignée cellulaire a été particulièrement utilisée pour toutes les mises au point de l'approche expérimentale développée pour identifier les sites de clivage de Tau.** Les cellules utilisées sont des lignées stables qui surexpriment de manière inductible l'isoforme de 1N4R de Tau sous forme sauvage (nommée WT pour Wild Type) ou portant la mutation P301S (nommée P301S) (Bretteville et al., 2009).

Cette mutation P301S est retrouvée dans les démences fronto-temporales liées au chromosome 17. Une troisième lignée stable, établie avec le vecteur d'expression inductible vide est utilisée comme contrôle (nommée TO).

III.B N1E-115

Cette lignée cellulaire a été établie au début des années 1970 en clonant la tumeur murine spontanée C-1300 (Amano et al., 1972). Ces cellules N1E-115 sont issues d'une lignée de neuroblastome. En comparaison aux cellules SH-SY5Y, cette lignée se transfecte de manière plus efficace. **Cette lignée cellulaire a été utilisée pour toute la caractérisation et les études fonctionnelles des fragments de Tau identifiés.** Ces études fonctionnelles ont été réalisées par transfection transitoire de plasmides codant les ADNc des fragments d'intérêt.

III.C CHO

Les cellules CHO pour « chinese hamster ovary » sont des cellules qui proviennent d'une biopsie d'un ovaire de hamster chinois. Ce modèle cellulaire, bien que très éloigné d'un neurone, présente la caractéristique de ne pas exprimer la protéine Tau. Cette lignée cellulaire a été ponctuellement utilisée pendant les études fonctionnelles.

Méthodes

I. Culture cellulaire

I. A Entretien des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules SH-SY5Y et CHO sont cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO BRL) supplémenté en sérum de veau fœtal 10%, en acides aminés non essentiels (GIBCO BRL) 1mM, en L-glutamine (GIBCO BRL) 2mM et en pénicilline/streptomycine 50U/ml. Les lignées cellulaires N1E-115 sont maintenues en culture dans du milieu DMEM exempt de pyruvate et sans ajout d'acides aminés non essentiels. La division et la mise en culture des cellules sont réalisées comme suit : les cellules sont 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 arrêtée par ajout de milieu de culture contenant du sérum ; après dissociation, une numération sur lame de Malassez (Invitrogen™) est effectuée et les cellules sont ensuite ensemencées dans les conditions appropriées, en fonction du protocole expérimental.

I.B Transfection transitoire

Les cellules en culture dans des plaques de culture six puits (surface 9 cm²), à 50% de confluence, sont transfectées en utilisant le polymère cationique PEI (Polyéthylénimine, Exgen500, EUROMEDEX). Un mélange ADN/Exgen dans 200µL de milieu DMEM dépourvu de sérum de veau fœtal est réalisé à raison de 3µg d'ADN pour 10µL d'Exgen. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 15 minutes puis répandu sur les cellules préalablement lavées au PBS. Après 3 heures, 2 mL de milieu de culture DMEM complet sont ajoutés. Les cellules sont récupérées 48 heures après pour les différentes analyses.

I.C Traitements pharmacologiques

Le nocodazole (Sigma) est utilisé à une concentration de 10 μ M pendant 20 minutes. La cytochalasine-B (Sigma) est utilisée à une concentration de 20 μ M pendant 1 heure. La tubacine (Sigma) est utilisée à une concentration de 1 μ M pendant 30 minutes.

II. Construction des vecteurs d'expression plasmidiques

II.A Amorces nucléotidiques

Les amorces « désignées » 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 pcDNA3.1 :

- **les amorces sens**, utilisées pour l'amplification des ADNc des fragments de troncation, qui comprennent le codon **ATG** dans un environnement **Kozak** sont les suivantes :

Met11-Tau : 5'- CAGTGTGGTGGGAATTC**GCCACCATG**GAAGATCACGCTGGGACGT - 3' ;

Gln124-Tau : 5' - CAGTGTGGTGGGAATTC**GCCACCATG**CAAGCTCGCATGGTCAGTAAAGCAAAGACGGG - 3' ;

Val229-Tau : 5' - CAGTGTGGTGGGAATTC**GCCACCATG**GTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCT - 3' ;

Gly261-Tau : 5' - CAGTGTGGTGGGAATTC**GCCACCATG**GGCTCCACTGAGAACCTGAGCACCAGC - 3' ;

- **l'amorce anti-sens** est identique pour les quatre différentes séquences codantes amplifiées :
5'- GATATCTGCAGAATTCTCACAAACCCTGCTTGGCCAGGGAGGCA - 3'.

II.B Amplification par PCR des ADNc et préparation du vecteur pcDNA3.1

Les ADNc sont amplifiés par PCR pour « 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 de l'isoforme 1N4R de Tau) 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 50µL. 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 pcDNA3.1 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.

II.C Clonage dans le vecteur plasmidique pcDNA3.1

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 DH5α chimiquement compétentes selon le protocole du fournisseur (InvitrogenTM). 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 (50µg/ml) afin de sélectionner les bactéries ayant intégré 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 servi au clonage et le kit « Go Taq Green Master Mix » (Go Taq DNA Polymerase, Green Go Taq Reaction Buffer 2X (pH 8,5), 400µM ATP, 400µM GTP, 400µM TTP, 400µM 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 plasmides est mesurée grâce au Nanodrop (Thermo Scientific) à une longueur d'onde de 260nm ; la qualité de la préparation des vecteurs est évaluée par les rapports A260/A280 et A260/A230 (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.

III. Analyses biochimiques

III. A Extractions protéiques

Selon le matériel et l'application en vue, les conditions d'extraction protéiques seront différentes :

III.A.1 Extraction pour la caractérisation par SDS-PAGE

Pour les caractérisations par WB, les échantillons de tissus cérébraux humains et murins sont traités de la manière suivante : un homogénat tissulaire (en moyenne 70mg de tissu) est préparé dans un premier temps, par sonication dans 200 μ L de tampon de cryoconservation Tris-Sucrose (Tris-HCl 10mM ; Sucrose 0,32M ; pH 7,4) additionné d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Complete mini EDTA-free Roches®). Ces homogénats tissulaires sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Pour les analyses en Western-Blot, 50 μ L de chaque homogénat d'hippocampe sont mélangés avec 50 μ L du tampon de lyse Ripa (NaCl 150mM ; NP40 1% ; Désoxycholate de sodium 0,5% ; SDS 0,1% Tris HCl 50mM ; pH=8,0). De la même façon, pour les extraits corticaux humains, 50 μ L de chaque homogénat sont mélangés avec 50 μ L 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 12 000g à 4°C . Les surnageants sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation ; leur concentration en protéines est estimée par dosage BCA (PIERCE® BCA Protein Assay Kit).

Pour les lignées cellulaires, les extraits destinés aux WB sont préparés comme suit : les cellules en plaques 6 puits sont rincées au PBS et lysées directement, sur glace, par ajout de 100 μ L de tampon Ripa avec inhibiteurs de protéases, soniquées (10 coups à 40 hertz) et homogénéisées au moins dix minutes à 4°C pour solubiliser les protéines. Les lysats sont ensuite centrifugés à 12000g pendant dix minutes à 4°C . La concentration en protéines est estimée par dosage BCA.

Pour une série d'expériences, les cellules sont lysées après aspiration du milieu de culture par ajout de 90µL de tampon de Laemmli LDS (Invitrogen™) préchauffé à 100°C, soniquées (10 coups à 40 Hertz) et analysées par WB.

III.A.2 Extraction en vue d'immunoprécipitation (IP)

Pour les IP réalisées à partir de tissus cérébraux humains, les homogénats tissulaires repris dans le tampon de cryoconservation sont extraits avec du tampon IP (Invitrogen™) complété avec du NaCl 100mM et des inhibiteurs de protéases (Complete mini EDTA-free Roche®). Les échantillons sont soniqués (30 coups à 40 hertz) et centrifugés 5 minutes à 2500g à 4°C. La concentration protéique du surnageant est estimée par dosage BCA.

Les extraits cellulaires destinés pour les IP sont préparés comme suit : les cellules cultivées en boîtes de 75 cm² sont rincées au PBS, traitées par une solution de Versene (Invitrogen™) pour faciliter la récupération des cellules dans du PBS. Les culots cellulaires sont récupérés après une centrifugation à 1200g pendant 6 min, à 4°C. Après aspiration du PBS, chaque culot cellulaire est lysé dans 100 µL de tampon IP (Invitrogen™) complété de : NaCl 100mM ; inhibiteurs de protéases. Les échantillons sont soniqués (30 coups à 40 hertz) et centrifugés 5 minutes à 2600g à 4°C. La concentration protéique du surnageant est estimée par dosage BCA.

III.A.3 Extraction en vue d'électrophorèse bidimensionnelle

Après rinçage des cellules au PBS, les protéines sont extraites dans le tampon suivant : urée : 7M, thiourée : 2M, CHAPS 4%. Les extraits sont ensuite soniqués (10 coups à 40 hertz), incubés sous agitation lente pendant 30 minutes et centrifugés 15 minutes à 14 000g à 4°C. Les surnageants sont récupérés et dosés par la méthode de Bradford (Bio-Rad). Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

III.B Electrophorèse monodimensionnelle

Les protéines totales des extraits sont séparées en fonction de leur masse moléculaire par migration en SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis). Un volume des extraits protéiques dosés au préalable est mélangé avec le volume adéquat du tampon de dépôt (LDS 4X et agent réducteur 10X (Invitrogen™)) de manière à avoir une

concentration en protéines équivalente entre l'ensemble des échantillons de l'analyse. Le mélange est chauffé dix minutes à 100 °C, puis déposé en gel d'acrylamide (gradient 4-12%, système NuPage, InvitrogenTM ; gel criterion 4-12%, Bio-Rad). La migration se déroule à un voltage constant de 200 volts pendant une heure dans une solution de tampon de migration MOPS (InvitrogenTM). Un marqueur de poids moléculaires est également déposé (InvitrogenTM).

III.C Electrophorèse bidimensionnelle

Pour l'isoélectrofocalisation (IEF), un mélange de 1,1µL de pharmalytesTM (pH 3-11, G&E Healthcare), 2,2µL de DestreakTM (G&E Healthcare) et une pointe de bleu de bromophénol (G&E Healthcare) est ajoutée aux homogénats protéiques. Les bandelettes de gels d'IEF (Immobiline DryDtrip pH 3-11, G&E Healthcare) sont réhydratées avec l'échantillon toute la nuit à température ambiante. Le programme de l'IEF comporte cinq étapes : 1h à 500V en palier, 1h à 1000V en gradient linéaire, 2h et 30 minutes à 6000V en gradient linéaire, 1 heure à 6000V et 10 minutes à 50V.

La seconde dimension se déroule de la manière suivante : avant la deuxième dimension, les bandelettes de gel sont rééquilibrées dans deux bains de 15 minutes contenant : Tris-HCl 25mM pH 6,8 ; DTT 20mM ; glycérol 10% ; SDS 5% ; bleu de bromophénol 0,05%. Les bandelettes sont ensuite déposées à la surface de gels Criterion Bis-Tris 12%. Le tampon de migration est du tampon XT MOPS 20X (Bio-Rad). La migration des protéines est réalisée à 200V pendant 1 heure.

III.D Western-Blot

Après électrophorèse mono- ou bidimensionnelle, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond® ECL, AMERSHAM) à un voltage constant de 30V pendant 75 minutes dans un tampon de transfert (Transfer Buffer, InvitrogenTM). L'efficacité du transfert est ensuite vérifiée par coloration des protéines au Rouge Ponceau (acide Trichloroacétique 3%, rouge ponceau 0,2%). Après un lavage au TNT (Tris 15 mM pH8 ; NaCl 140 mM ; Tween20 0,5%), les sites de fixation non spécifiques sont saturés par incubation dans une solution de 5% de lait dans le TNT 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 5](#)). Le lendemain, les membranes sont rincées trois fois dix minutes au TNT ,

puis incubées pendant 45 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, anti-immunoglobulines totales de lapin (Vector), de souris (Vector), de chèvres (Vector) ou anti-IgM de souris (Sigma). Trois rinçages de dix minutes au TNT sont effectués et la révélation est réalisée par utilisation du kit ECL (G&E Amersham). L'empreinte du signal est captée soit sur un film photosensible soit par acquisition au LAS 3000. La quantification des immuno-empreintes est réalisée par mesure de la densitométrie via le logiciel ImageJ (Scion Image, USA).

Anticorps	Espèce	Dilution	Application(s)	Fournisseur
Tau-Nter	Lapin	1/10 000	WB	Labo
Tau-Cter	Lapin	1/10 000 - 1/1000	WB - ICC	Labo
Tau-5	Souris	1/100	IP	Invitrogen
pSer199	Lapin	1/2000	WB	Labo
pSer396	Lapin	1/10 000	WB	Invitrogen
AT180	Souris	1/10 000	WB	Pierce
12E8	Lapin	1/1000	WB	Labo
α -tubuline (tubuline-totale)	Souris	1/1000 - 1/200	WB - ICC	Sigma
α -tubuline acétylée	Souris	1/2000 - 1/200	WB - ICC	Sigma
α -tubuline tyrosinée	Souris	1/1000	WB	Sigma
α -tubuline détyrosinée	Souris	1/2000	WB	Abcam
β -actine	Souris	1/10 000	WB	Sigma
GAPDH	Lapin	1/10 000	WB	Santa Cruz
Lamine-B	Chèvre	1/1000	WB	Santa Cruz
HDAC6	Lapin	1/1000	WB	Cell signaling
α -TAT1	Chèvre	1/1000	WB	Santa Cruz

Tableau 5 : Tableau présentant l'ensemble des anticorps utilisés pendant cette étude. WB : western blot, ICC : immunocytochimie, IP : immunoprécipitation

III.E Coloration des protéines à l'argent en vue d'analyse en spectrométrie de masse

Après migration, les gels sont rincés deux fois à l'eau ultrapure pendant 5 minutes. Les protéines sont ensuite fixées par incubation du gel deux fois une heure dans le tampon de fixation (50% d'éthanol à 96%, 3% d'acide phosphorique à 85%). Deux lavages de vingt minutes à l'eau ultrapure sont ensuite effectués, suivis d'un lavage d'une minute au thiosulfate (thiosulfate 0,02%). Après un rinçage rapide à l'eau ultrapure, la coloration à l'argent s'opère pendant 30 à 45 minutes par incubation dans une solution à l'argent (nitrate d'argent 0,1% ; 0,024% de formaldéhyde à 37%). Les gels sont rincés avec une solution de carbonate de sodium 2,5%. Pour la révélation, les gels sont incubés dans le tampon de révélation (carbonate de sodium 2,4% ; 10% de thiosulfate de sodium à 37% ; 0,024% de formaldéhyde à 37%). Dès

visualisation des protéines colorées à l'intensité voulue, la révélation est arrêtée par ajout d'une solution stop (EDTA 1,82% ; acide acétique 5%). Les bandes d'intérêt sont découpées et conservées dans l'eau ultrapure pour traitements ultérieurs en vue d'analyses en spectrométrie de masse (analyses réalisées par des collaborateurs, laboratoire de spectrométrie de masse biologique et protéomique de l'ESPCI, USR3149 CNRS, Paris).

III.F Immunoprécipitation

L'IP en vue d'analyses en spectrométrie de masse est réalisée avec le kit Dynabead Co-immunoprécipitation Kit (InvitrogenTM). Deux étapes principales sont effectuées, une première étape de couplage de l'anticorps souhaité aux billes magnétiques et la seconde étape dans laquelle les extraits protéiques sont incubés avec les anticorps couplés aux billes.

Etape 1 : le couplage. Pour les mises au point de l'IP, 1 à 5 mg de billes magnétiques sont pesés dans des tubes low-binding (SorensonTM). Les billes sont alors rincées dans 1mL du tampon C1 (fourni dans le kit). Les billes sont collectées au fond du tube grâce à un portoir magnétique et le tampon C1 est éliminé. Cinq µg d'anticorps par mg de billes sont ajoutés aux billes avec mélange de tampons C1 et C2 (dans les proportions recommandées par le fournisseur) pour un volume final de 500µL. Le mélange billes-anticorps est incubé pendant la nuit à 4°C à faible rotation (5 rpm). Le lendemain, les anticorps couplés aux billes sont collectés au fond du tube à l'aide du portoir magnétique. Le complexe anticorps-billes est soumis à une série de lavages séquentiels avec des tampons distincts (les tampons HB, LB, SB, fournis dans le kit) à l'issue desquels il est conservé dans le tampon SB, à 4°C.

Etape 2 : l'IP. Le complexe anticorps-billes est rincé deux fois dans 400µL de tampon IP. Le complexe est ensuite resuspendu dans 300µL d'extraits protéiques d'une concentration de 1µg/µL en protéines. Le mélange est incubé pendant la nuit à 4°C à faible rotation. Le lendemain, le complexe protéines fixées-anticorps-billes est collecté au fond du tube à l'aide du portoir magnétique, et le surnageant est récupéré. Il est constitué de l'ensemble des protéines non retenues par le complexe anticorps-billes (la fraction NR). Une série de 3 à 10 lavages est réalisée pour éliminer les protéines fixées de manière non spécifique au complexe anticorps-billes. Seul le surnageant issu du premier lavage est récupéré pour analyses (la fraction L). L'étape d'élution est réalisée par ajout de 50µL à 200µL de tampon EB (tampon fourni dans le kit, pH 2,8). Cette étape permet d'éluer les protéines fixées de manière spécifique sans décrocher de manière importante les anticorps des billes, la fraction collectée est appelée fraction IP (ou éluât), le complexe billes-anticorps issu de l'étape d'élution constitue la fraction

B conservée pour analyser l'efficacité d'élution. Les différentes fractions récupérées sont mélangées volume à volume avec le tampon de dépôt 2X (LDS + agent réducteur). L'efficacité de l'IP est évaluée ensuite par analyse des différentes fractions par WB.

Un deuxième système d'IP a été utilisé, le système True-Blot (eBioscience) : 300 µg de protéines extraites de la même manière que précédemment sont incubés avec la quantité d'anticorps souhaitée (5 µg environ) et 30 µL de la suspension d'anticorps secondaire couplé aux billes d'agarose TB (anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin en fonction de l'origine de l'anticorps primaire) pendant la nuit à 4°C à faible rotation (5 rpm). Le lendemain la fraction NR est récupérée suite à une centrifugation à 2200 g pendant une minute. Les immunocomplexes sont lavés trois fois pour éliminer les fixations non spécifiques (fraction L) avec le tampon IP. Le complexe bille-anticorps-protéines d'intérêt est repris à la suite du dernier lavage dans 50µL de tampon de dépôt 2X. Les échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant 10 minutes pour analyser l'efficacité de l'IP.

Pour le WB, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase utilisé provient du système True Blot. L'intérêt de ce dernier est qu'il ne reconnaît que les anticorps conformationnels. Ainsi, les anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation ne seront donc pas détectés lors de l'immunoréactivité car ils ont été dénaturés par chauffage à 100°C en présence d'agent réducteur.

III.G Fractionnement microtubulaire

Les cellules en culture sont rincées avec le tampon microtubulaire préchauffé à 37°C (Pipes 80mM pH 6,8, EGTA 1mM, MgCl₂ 1mM, Glycérol 30%) puis lysées avec ce même tampon supplémenté en Triton X100 0,1% et inhibiteurs de protéases. Les lysats sont ensuite ultracentrifugés à 27°C pendant 18 minutes à 100 000g (Optima TL Ultracentrifuge, BECKMAN). Les surnageants sont récupérés et constituent la fraction cytosolique contenant les protéines Tau non liées aux microtubules. Les culots sont lavés par reprise dans le tampon de lyse et resoumis à la même ultracentrifugation, le surnageant est éliminé et le culot, correspondant à la fraction microtubulaire, est resuspendu avec le tampon Ripa dans un volume équivalent à celui de la fraction cytosolique. Les échantillons sont ensuite soumis aux ultrasons, homogénéisés à 4°C pendant 1 heure. Ensuite, la fraction cytosolique est dosée grâce au Kit BCA afin de déposer la même quantité de protéines dans les fractions cytosoliques de chaque échantillon. Le volume utilisé pour déposer les culots est identique à celui des fractions cytosoliques. Le même protocole est réalisé pour le fractionnement à partir des cellules traitées

au Nocodazole à une concentration de 10 μ M, pendant 10 minutes.

III.H Fractionnement nucléaire

Les cellules en cultures sont rincées au PBS et lysées dans le tampon suivant : Tris-HCl 50mM pH7,5 ; NaCl 150mM ; EDTA 5mM ; Glycérol 10%, puis, les lysats sont incubés sur glace pendant 15min. Les extraits sont ensuite centrifugés à 3000g pendant 5min à 4°C. Le surnageant correspond à la fraction cytoplasmique. Le culot correspond à la fraction nucléaire. Tous deux sont lavés deux fois. La fraction cytosolique est dosée grâce au Kit BCA afin de déposer la même quantité de protéines dans les fractions cytosoliques de chaque échantillon. Le volume utilisé pour déposer la fraction nucléaire est identique à celui des fractions cytosoliques.

III.I Dosage d'activité HDAC

Pour doser l'activité enzymatique d'HDAC6, les extraits cytoplasmiques dosés préparés précédemment sont utilisés comme suit : 10 μ g d'extraits protéiques sont incubés dans une plaque 96 puits avec les solutions du kit HDAC-GloTM I/II (Promega) préparées en suivant le protocole fourni. Le mélange réactionnel est laissé 30 minutes à température ambiante et les résultats sont obtenus par mesure de la luminescence émise à l'aide du lecteur de microplaque Mithras LB-940. La tubacine (Sigma), inhibiteur spécifique d'HDAC6, est utilisée comme contrôle positif d'inhibition à une concentration de 1 μ M.

IV. Imagerie cellulaire par microscopie confocale

Pour l'ensemble des expériences en vue d'imagerie confocale, les cellules ont étéensemencées dans des chambres de culture LAB-TEK (BD BioScience) préalablement coatées avec une solution de poly-D-lysine (Sigma). Deux jours après transfection, les cellules, traitées ou non à la cytochalasine-B ou au nocodazole, sont rincées au PBS et directement fixées au méthanol froid à -20°C pendant 20 minutes. Après deux rinçages au PBS, les cellules fixées sont perméabilisées avec du PBS et du Triton-X100 à 0,2% pendant 10 minutes. Après saturation pendant 45 minutes avec une solution de saturation (PBS sérum albumine bovine 2%), les immunocytochimies sont réalisées à l'aide des anticorps ([Tableau 5](#) pour les conditions d'utilisation). Les marquages sont révélés avec des anticorps secondaires chèvre

anti-lapin IgG (H+L) couplés avec des Alexa Fluor®488 ou Alexa Fluor®468 (Molecular Probes). Le milieu de montage utilisé pour les lames est le milieu Vectashield (Vector) avec DAPI. 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 1µM, dans l'axe z, rassemblées par MIP (Maximum Intensity Projection).

V. Analyse protéomique

L'ensemble des expériences et des analyses protéomiques a été réalisé au sein de l'ESPCI au laboratoire de spectrométrie de masse biologique, USR3149 CNRS, en collaboration avec Yann Verdier, Giovanni Chiappetta et Joëlle Vinh.

V.A Digestion en gel

Les bandes découpées à partir du gel coloré à l'argent sont lavés avec de l'eau milliQ puis de l'acétonitrile 100%, avant d'être séchées au speedvac. Les protéines sont ensuite réduites par incubation 30 min à 56°C avec 100 µL d'une solution de Dithiothréitol 10 mM (Sigma) ; NH₄HCO₃ 50mM (Sigma) ; et après un lavage avec de l'acétonitrile, réduites par incubation 20 min dans le noir avec 100 µL d'une solution d'Iodoacétamide 55mM (Sigma) ; NH₄HCO₃ 50mM. Après un lavage avec un volume de NH₄HCO₃ 50mM pendant 10 min, sous agitation, suivi de deux lavages avec de l'acétonitrile 100%, les morceaux de gel sont recouverts d'une solution de trypsine (Roche) à 12,5 ng/µL dans du NH₄CO₃ 25mM ; CaCl₂ 5mM. La digestion est réalisée par incubation 16h à 37°C. Après inactivation de la trypsine avec de l'acide formique 5%, les peptides sont ensuite extraits du gel avec de l'acide formique 5% puis de l'acétonitrile. Les surnageants contenant les peptides sont regroupés, séchés au speed vac, et repris dans une solution d'acide formique 1%. Les peptides sont ensuite désalés et concentrés sur une micro-colonne C18 ZipTip (Millipore), en respectant le protocole du fournisseur. L'éluat est de nouveau séché au speed vac, et repris dans 3 µL d'une solution H₂O/AF 0,1%.

V.B Marquage des fonctions amines primaires

Après décongélation, les échantillons protéiques obtenus après élution sont réduits par addition de 50 µL de DTT 10 mM et incubation 2h à 37°C, puis traités avec 50 µL de

idoacétamine 50 mM et incubation 30 min dans le noir. Le pH est ensuite ajusté à 8 avec 18 µL de Tris HCl 1,5M pH 8,8 ; et le marquage est réalisé avec 100 µL de dansyl (à 5 µg/µL dans l'acétonitrile) ou à la biotine (à 5 µg/µL dans du diméthyle foramide) et incubation 2h à 37°C. Le dansyl est éliminé par filtration à travers une colonne Amikon (Millipore, cut off 10 kDa) par centrifugation 15 min à 12000g puis l'échantillon est lavé deux fois avec 800 µL de bicarbonate d'ammonium 50 mM (centrifugation dans les mêmes conditions). La biotine est neutralisée par ajout d'une solution d'hydroxylamine à 50% 200nM. Les protéines sont récupérées dans un volume de 60 µL et digérées par la trypsine (Roche®) ou par l'Asp-N ; 3 µL d'enzyme à 40 ng/µL (Roche®) pendant une nuit à 37°C.

Dans le cas d'échantillons dansylés (échantillons cellulaires) : le dansyl est éliminé par filtration à travers une colonne Amikon (Millipore, cut off 10 kDa) par centrifugation 15 min à 12000g puis l'échantillon est lavé deux fois avec 800 µL de bicarbonate d'ammonium 50 mM.

Dans le cas d'échantillons biotinylés (échantillons tissulaires) : les échantillons sont dilués dans 270 µL de PBS et incubés 1h à température ambiante avec de la streptavidine fixée sur des billes d'agarose (Pierce, ref RJ1550). Après une centrifugation et élimination du surnageant (fraction « unbound »), les billes sont recouvertes de 150 µL de DTT 10 mM, pendant 30 min à température ambiante, et acidifiées avec 10 µL d'AF à 50%. Deux µL de l'échantillon sont injectés dans la chaîne « Mérapie ».

IV.C Analyses LC-MS/MS

Les séparations chromatographiques sont réalisées sur une colonne C18 75µm 15cm avec un gradient acétonitrile selon une méthode optimisée : méthode GradDionex 50%B UDP6 6min 60min A B (start 0%) flush 11524, sur la Chaîne « Merapi » (Dionex U3000), avec A= 2% AcN, 0.1% acide formique et B= 80%AcN, 0.1%acide formique (Figure 28).

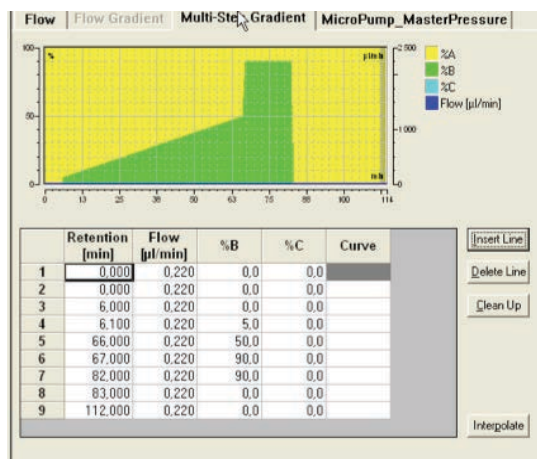


Figure 28: Méthode de séparation chromatographique en gradient d'acétonitrile. A= 2% AcN, 0.1% acide formique et B= 80%AcN, 0.1%acide formique.

La méthode d'acquisition en spectrométrie de masse est une méthode en data dépendant acquisition dite en top 7, avec exclusion dynamique, où les spectres MS/MS sont sauvegardés en mode LTQ centroid.

IV.D Interrogation des banques

Les acquisitions sont retraitées avec le logiciel Proteome Discoverer v. 1.3.0.339 qui permet de réaliser des recherches à l'aide du moteur de recherche Mascot v.2.2.04 (Matrixscience) en utilisant les paramètres suivants :

Banque : banque maison « Tau » contenant la séquence de 6 isoformes de Tau humaines, et celle de la trypsine et de l'Asp-N ; Banque Swiss Prot.

Enzymes : semi-trypsique ; semi-Asp-N

Peptide mass tolérance : ± 5 ppm

Fragment mass tolérance : ± 0.5 Da

Sites de clivage manqués : 1

Modifications variables : Carbamidométhyl, oxidation, pyroGlu N-term, Acetyl N-term, thio-propionitiation/dansylation et phosphorylation.

IV.E Analyses SRM pour « *selected monitoring reaction* »

Afin d'avoir une estimation quantitative de la quantité de peptides, des peptides standards marqués aux acides aminés lourds (Heavy peptide AQUA Basic, ThermoFisher Scientific) sont utilisés. Les peptides standards ont été repris à une concentration de 100 pmol/ μ L et stockés à -80° jusqu'à utilisation. Ils sont ensuite dilués 200 fois, et 1 μ L de cette solution est mélangé à 5 μ L d'échantillon préparé comme précédemment.

Les séparations chromatographiques sont réalisées sur une colonne C18 75 μ m 15cm avec un gradient acétonitrile selon la méthode précédemment décrite sur la Chaîne « Merapi » (Dionex U3000). Les analyses sont réalisées sur un spectromètre de masse Vantage (ThermoFisher Scientific). Les acquisitions sont retraitées par le logiciel PinPoint.

V. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en tant que moyenne $\pm$ erreur type. Les résultats ont été analysés par one-way ANOVA suivi d'un test post-hoc LSD Fisher, grâce aux logiciels Prism

(Graph Pad Software Inc., USA).

Résultats

Chapitre 1 : Identification de nouveaux sites de clivage de la protéine Tau par une approche protéomique

La caractérisation biochimique des agrégats de protéine Tau retrouvés au sein de tissus cérébraux de patients atteints de la MA révèle l'existence de tout un panel de fragment de troncation amino- et carboxy-terminaux. Parmi cet ensemble de fragments, seuls deux sites de clivage carboxy-terminaux, les résidus Glu391 et Asp421, ont été identifiés et validés par des approches immunologiques (Novak et al., 1993; Gamblin et al., 2003b; Rissman et al., 2004). La nature des autres sites de clivage et les conséquences cellulaires associées à leur génération restent inconnues. Déterminer l'identification de ces sites de clivage constitue donc un prérequis nécessaire pour étudier l'implication de ces fragments amino- et carboxy-terminaux dans la biologie et la physiopathologie de la protéine Tau.

Ce premier chapitre des résultats est dédié à l'ensemble des travaux qui ont permis d'aboutir à l'identification d'une vingtaine de sites de clivage amino-terminaux au sein de tissus cérébraux humains. Dans une première partie, le développement du protocole expérimental réalisé à partir de lignées cellulaires sera exposé. Puis, dans une seconde partie, les résultats obtenus à partir de tissus cérébraux humains seront présentés.

I. Comment identifier des sites de clivage ?

Principalement deux sites de clivage ont été identifiés sur la protéine Tau, les sites carboxy-terminaux Glu391 et Asp421. D'autres sites, qui restent encore être validés dans plusieurs études, ont également été identifiés. Il existe plusieurs approches pour identifier ces sites de clivage. L'une d'entre elles est basée sur des cartographies immunologiques auxquelles s'ajoute la connaissance des séquences consensus d'une protéase impliquée dans la troncation de Tau et sur le développement d'un outil immunologique spécifique du site de clivage d'intérêt pour rechercher la présence du site *in situ*. Cette approche a notamment été utilisée pour identifier les sites carboxy-terminaux Asn368, Asp402 et Asp421 (Gamblin et al., 2003b; Guo et al., 2004; Rissman et al., 2004; Zhang et al., 2014). Les principales limites ici demeurent d'une part dans la connaissance des protéases impliquées dans la troncation et d'autre part dans leur séquence consensus (si elles en possèdent une) afin de générer l'outil immunologique.

Une autre approche a également été utilisée pour identifier notamment les sites Glu391 et les sites indépendants de protéolyse enzymatique : les résidus Asp255, Asp265, Asp296 et Asp327. Les fragments de troncation de Tau étant systématiquement associés à un contexte pathologique, quelques travaux ont tiré avantage de l'insolubilité des agrégats de Tau qui contiennent ces espèces tronquées pour les purifier et pour utiliser des approches de spectrométrie de masse afin d'identifier des sites de clivage (Wischik et al., 1988; Watanabe et al., 1999; 2004; Zilka et al., 2012). Cette approche a l'avantage de partir sans à priori vis-à-vis de sites consensus d'une protéase mais elle exclut l'existence de fragments solubles et/ou physiologiques. De façon générale, les sites de clivage identifiés sur la protéine Tau sont des sites carboxy-terminaux. Les quatre sites amino-terminaux identifiés, Asp25, Ala125, Thr169 et Glu187, résultent d'études « *case report* » et leur validation requiert des travaux supplémentaires. C'est dans ce contexte que nous avons choisi d'utiliser une approche protéomique nous permettant ; 1) de **s'affranchir de la connaissance de la séquence consensus d'une protéase potentielle** ; 2) de ne **pas se cantonner à l'aspect pathologique** de la troncation en travaillant uniquement sur des protéines Tau purifiées à partir d'agrégats ; 3) d'identifier de **nouveaux sites de clivage amino-terminaux**.

L'approche développée (Figure 29) consiste en une étape d'enrichissement par immuno-précipitation (IP) de la protéine Tau et de ses fragments à l'aide de l'anticorps Tau-5 dont l'épitope de reconnaissance est médian à la protéine Tau (résidus 218-225) (Porzig et al., 2007). L'étape suivante vise à marquer par dansylation ou biotinylation au niveau de leur extrémité amino-terminale les espèces de Tau immunoprécipitées afin d'identifier les sites de clivage par couplage LC-MS/MS (Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry) (Chiappetta et al, 2010). Ce marquage a pour but d'augmenter la détectabilité des peptides présentant des fonctions amines primaires libres et de les enrichir par chromatographie d'affinité. Ces approches de spectrométrie de masse (les modifications chimiques et les analyses en spectrométrie de masse) sont réalisées en collaboration avec les docteurs Yann Verdier, Giovanni Chiappetta et Joëlle Vinh (laboratoire de spectrométrie de masse biologique et protéomique de l'ESPCI, Paris). Après marquage, les produits d'IP sont soumis à une digestion enzymatique via l'utilisation de la trypsine (qui génère des peptides présentant des résidus lysine ou arginine carboxy-terminaux) ou de l'Asp-N (qui génère des peptides présentant un résidu aspartate amino-terminal). Après digestion, une séparation chromatographique permet d'enrichir, via le marquage des fonctions amines primaires, les peptides marqués. L'analyse LC-MS/MS permet finalement d'identifier les sites de clivage

amino-terminaux par détection des peptides qui présentent une fonction amine primaire marquée.

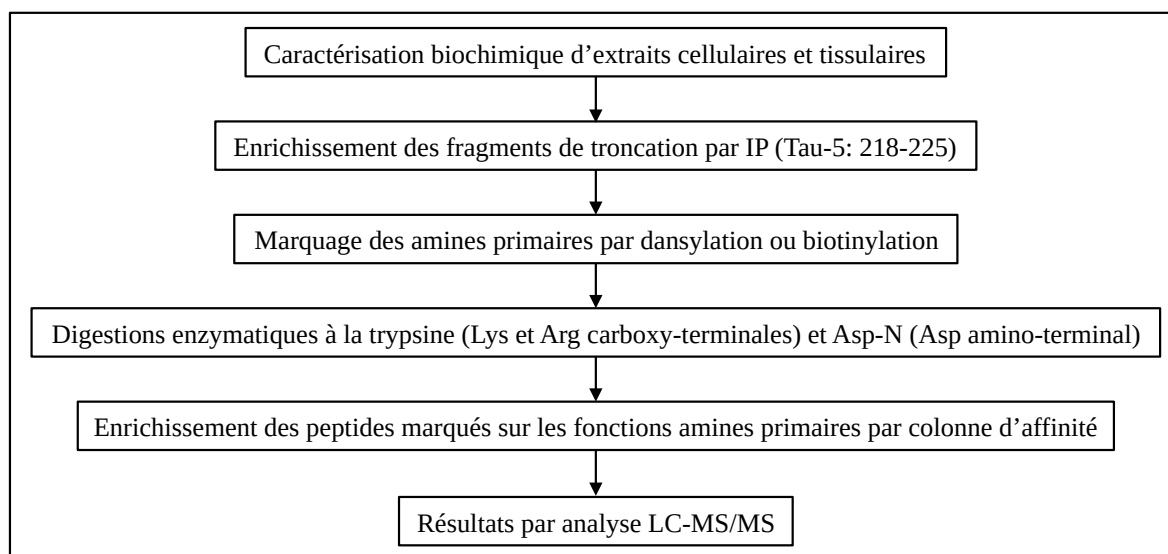


Figure 29 : Approche développée pour identifier les sites de clivage amino-terminaux de Tau. Après leur caractérisation, les fragments de protéolyse de Tau sont enrichis par immunoprécipitation (IP) pour être ensuite marqués et digérés. Les peptides digérés sont enrichis sur colonne d'affinité et sont ensuite analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS/MS).

Cette approche débute par une caractérisation générale des fragments de troncation de Tau présents dans le tissu cérébral humain mais également dans un modèle cellulaire de surexpression de Tau qui présentant des fragments de troncation de Tau. En effet, bien que la finalité de cette approche soit d'identifier **l'acide aminé amino-terminal des fragments de troncation de Tau** à partir de tissus cérébraux humains, l'ensemble des mises au point requises afin d'optimiser chacune des étapes a été réalisé à partir d'un modèle cellulaire.

II. Identification de sites de clivage à partir d'une lignée cellulaire

La stratégie utilisée pour caractériser les fragments de troncation de Tau au sein d'un modèle cellulaire est l'analyse par WB utilisant des anticorps qui ciblent des régions distinctes de la protéine Tau, notamment les extrémités amino-terminales grâce à l'anticorps Tau-Nter (visualisation des formes tronquées au niveau carboxy-terminal) et carboxy-terminales grâce à l'anticorps Tau-Cter (visualisation des formes tronquées au niveau amino-terminal). Il s'agit d'anticorps polyclonaux dirigés respectivement contre les dix-neuf premiers acides aminés de Tau (Tau-Nter) ou les quinze derniers (Tau-Cter) (Sergeant et al., 1997).

II.A Caractérisation de la troncation de Tau *in cellulo*

Le modèle cellulaire choisi pour mettre au point l'ensemble des étapes est un modèle de neuroblastome humain surexprimant l'isoforme 1N4R de Tau de façon inductible et présentant des fragments de troncation de Tau. Il s'agit de la lignée cellulaire SH-SY5Y. A l'instar des modèles cellulaires décrits dans la littérature, et à l'inverse des modèles murins transgéniques, la surexpression cellulaire de protéines Tau sauvages ou mutées ne s'accompagne pas de phosphorylation anormale ni d'agrégation (Bretteville et al., 2009). L'utilisation de ces modèles est donc intéressante pour caractériser la troncation de Tau indépendamment de sa phosphorylation pathologique et de son agrégation, mais surtout pour permettre de mettre au point les différentes étapes expérimentales préalables à des analyses sur tissus cérébraux.

Des extraits de cellules Tau-WT, Tau-P301S, mutation décrite dans les DFTP-17 (Dumanchin et al., 1998; Spillantini and Goedert, 2013) et Mock (lignée contrôle possédant le vecteur plasmidique inductible sans transgène) traitées pendant 48 heures à la tétracycline pour induire l'expression du transgène ont été utilisés pour caractériser le profil de troncation de Tau. Les résultats obtenus avec les anticorps dirigés contre les parties amino- et carboxy-terminales de Tau révèlent la protéine Tau intacte sous forme d'une immuno-empreinte de masse moléculaire apparente d'environ 58kDa ([Figure 30](#)). Toutefois, il faut noter que l'affinité de l'anticorps Tau-Nter est inférieure pour Tau-P301S exprimée dans la lignée par rapport à la Tau-WT, expliquant la différence d'immuno-réactivité observée avec cet anticorps entre les deux lignées cellulaires. Les résultats indiquent la présence de formes tronquées au sein des deux lignées cellulaires surexprimant Tau. Le profil obtenu avec l'anticorps Tau-Cter présente des différences quantitatives et qualitatives entre les 2 lignées cellulaires, qui peuvent s'expliquer par la présence de la mutation. Ces résultats mettent donc en évidence l'existence de deux fragments amino-terminaux majeurs, reflet d'un clivage carboxy-terminal et d'une multitude de fragments carboxy-terminaux. Ceci suggère que le domaine amino-terminal de Tau est plus sensible à la protéolyse que son domaine carboxy-terminal.

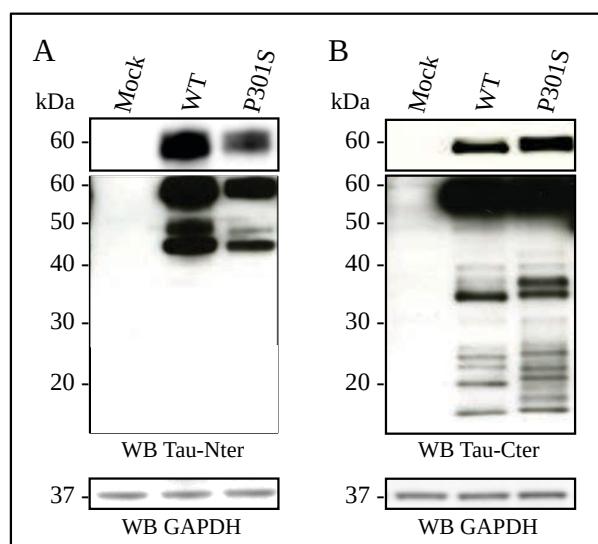


Figure 30: Figure représentative de la caractérisation par WB de la troncation de Tau dans les lignées cellulaires surexprimant Tau. 10µg de protéines extraites à partir de cellules dites « contrôle » (Mock), Tau-WT et Tau-P301S ont été analysés par WB. La protéine Tau intacte est révélée avec l'anticorps Tau-Nter (A) ou avec l'anticorps Tau-Cter (B) à faible exposition ou à exposition plus forte pour visualiser les formes tronquées. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge sur la même membrane.

II.B Enrichissement de la protéine Tau et de ses fragments par IP

Pour augmenter nos chances d'identifier des sites de clivage des fragments de troncation de Tau, des mises au point d'un protocole de purification de la protéine Tau et de ses fragments par immunoprécipitation, qui serait optimal pour une identification par spectrométrie de masse (SM), ont été entreprises à partir de la lignée cellulaire de surexpression de la protéine Tau sauvage caractérisée précédemment. Les IP ont été réalisées en utilisant un système de billes magnétiques adapté pour des purifications en vue d'analyses par SM (Dynabead Co-immunoprécipitation Kit). Les mises au point de cette étape d'enrichissement par IP ont notamment pour but d'évaluer la quantité de matériel protéique optimale pour une détection en LC-MS/MS et d'optimiser les étapes clés de l'IP :

- l'étape du couplage de l'anticorps servant à l'IP avec un système de billes magnétiques.
- l'étape d'IP en elle même dans laquelle il faut estimer la quantité de protéines idéale à incuber avec le complexe billes-anticorps.

Les IP ont été naturellement envisagées avec les anticorps utilisés pour la caractérisation Tau-Nter et Tau-Cter.

En ce qui concerne l'étape de couplage, des quantités croissantes d'anticorps par mg de billes magnétiques ont été utilisées. L'efficacité du couplage, qui se définit donc par la liaison de l'anticorps avec les billes magnétiques, a été testée en analysant, après électrophorèse et coloration à l'argent, la répartition des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines entre les différentes fractions générées lors du couplage : la fraction couplée aux billes (récupérées à la suite de nombreux lavages), la fraction des lavages et la fraction non retenue (récupérée à la

suite de l'incubation anticorps/billes). A l'issue des différentes analyses (résultats non montrés), la condition retenue est celle de 5µg d'anticorps par mg de billes. Les mises au point de l'IP ont été réalisées en variant la quantité et la concentration des protéines, provenant des lysats de cellules Tau-WT ou Tau-P301S. Dans une partie des expériences, les cellules contrôles (TO) ont également été utilisées pour valider la spécificité des protéines purifiées.

L'efficacité de l'IP, qui se définit par la capture de la protéine Tau et de ses fragments, est évaluée par analyse WB de la répartition des protéines Tau dans les 4 fractions générées lors du protocole expérimental : la fraction NR (pour Non Retenue) contient les protéines de l'extrait non captées par les anticorps couplés aux billes ; la fraction L (pour Lavage), dans laquelle sont retrouvées les protéines qui auraient pu se fixer de manière non spécifique au complexe billes-anticorps; la fraction IP qui contient les protéines captées spécifiquement par l'anticorps ; la fraction B (pour Billes) est composée des billes et des anticorps qui y sont restés couplés, et potentiellement les protéines non éluées.

L'ensemble des résultats des différentes mises au point s'est révélé négatif (non montré). En effet, l'analyse de la fraction IP montrait que ni la protéine Tau intacte ni ses formes tronquées n'étaient captées par les anticorps Tau-Nter et Tau-Cter utilisés. La protéine Tau et ses fragments se trouvaient dans la fraction NR. Ceci nous a amené à envisager la possibilité que ces deux anticorps Tau-Nter et Tau-Cter utilisés, qui sont fonctionnels en WB, ne soient pas immunoprécipitants, sans exclure la possibilité que le problème soit lié au système d'immunoprécipitation utilisé. Ainsi, les anticorps Tau-Nter et Tau-Cter ont été utilisés avec un autre système d'IP (TrueBlot). Ce système n'est pas adapté à des purifications en vue d'analyses par SM mais a été validé au sein de l'équipe pour des IP de Tau en vues d'analyses par WB. Un autre anticorps validé pour l'application IP a été également utilisé, l'anticorps Tau-5. Les résultats obtenus montrent clairement que les anticorps Tau-Cter (non montré) et Tau-Nter ne sont pas immunoprécipitants, à l'inverse de l'anticorps Tau-5. (Figure 31). Au vu de ces résultats, l'IP ne peut donc être réalisée avec les anticorps Tau-Nter et Tau-Cter. De manière encourageante, ces résultats montrent d'un autre côté que même si une partie des protéines d'intérêt se trouve dans la fraction non retenue lorsque l'IP est réalisée avec Tau-5, la forme intacte de Tau et des fragments de troncation caractéristiques qui sont détectés avec l'anticorps Tau-Nter sont retrouvés dans la fraction IP ce qui valide l'utilisation de l'anticorps Tau-5. Ainsi, les mises au point et **l'ensemble des enrichissements réalisés pour identifier des sites de clivage de Tau sont basés sur l'utilisation de l'anticorps monoclonal Tau-5**, qui reconnaît une région centrale de Tau (région comprise entre les résidus 218-225).

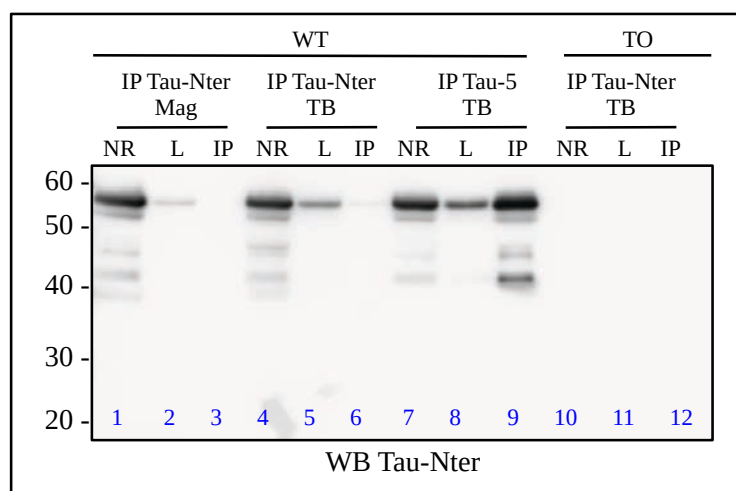


Figure 31: Analyses par électrophorèse des immunoprécipitations Tau-Nter et Tau-5 à partir d'extraits de cellules Tau-WT. Dans chaque condition, un aliquot de fraction NR, L et IP est analysé en WB avec l'anticorps Tau-Nter. Ces échantillons proviennent d'IP-Tau-Nter par système « Dynabeads » (Mag ; pistes 1, 2 et 3), IP-Tau-Nter en système True-Blot (TB ; pistes 4, 5, et 6), IP-Tau5 en système TB (pistes 7, 8 et 9). Un aliquot des mêmes fractions dérivant d'une IP-Tau-Nter système True-Blot à partir de TO est également analysé (TB ; pistes 10, 11 et 12).

De nouvelles IP ont été mises en place en utilisant des quantités de billes magnétiques et de matériel protéique plus importantes, tout en gardant le rapport quantité de protéines/complexe billes-anticorps de la condition établie comme optimale, ceci afin de purifier Tau et surtout ses fragments en quantité suffisante. La fraction IP ainsi que des échantillons des autres fractions de l'IP ont été analysés après électrophorèse par WB et par coloration à l'argent suivie d'une analyse en SM (Figure 32).

La caractérisation des produits d'IP par WB montre que l'approche permet d'enrichir, en plus de la protéine Tau intacte, des fragments de troncation amino- et carboxy-terminaux (Figure 32 A et B). Sans surprise, certains fragments carboxy-terminaux qui possèdent une faible masse moléculaire apparente sont retrouvés dans la fraction NR car ils ne contiennent pas l'épitope reconnu par l'anticorps Tau-5. Cet enrichissement en fragments de troncation de Tau a par ailleurs été confirmé par l'analyse LC-MS/MS de bandes colorées à l'argent obtenues après migration électrophorétique et coloration à l'argent de la fraction d'IP (Figure 32 C et D). La coloration à l'argent révèle que l'extrait total qui renferme l'ensemble des protéines de l'extrait présente comme attendu une multitude de bandes protéiques. Au niveau de la fraction IP, un certain nombre de bandes sont visualisées, dont celles correspondant aux chaînes lourdes et légères des immunoglobulines. Dans chacune des bandes analysées (allant de 26 à 100 kDa), des peptides amino- et carboxy-terminaux de Tau ont été retrouvés, que ce soit dans des masses moléculaires faibles ou plus importantes suggérant que Tau serait présente sous forme de

complexes. L'ensemble des séquences peptidiques retrouvées dans chacune des bandes est présenté en annexes ([annexe I](#)).

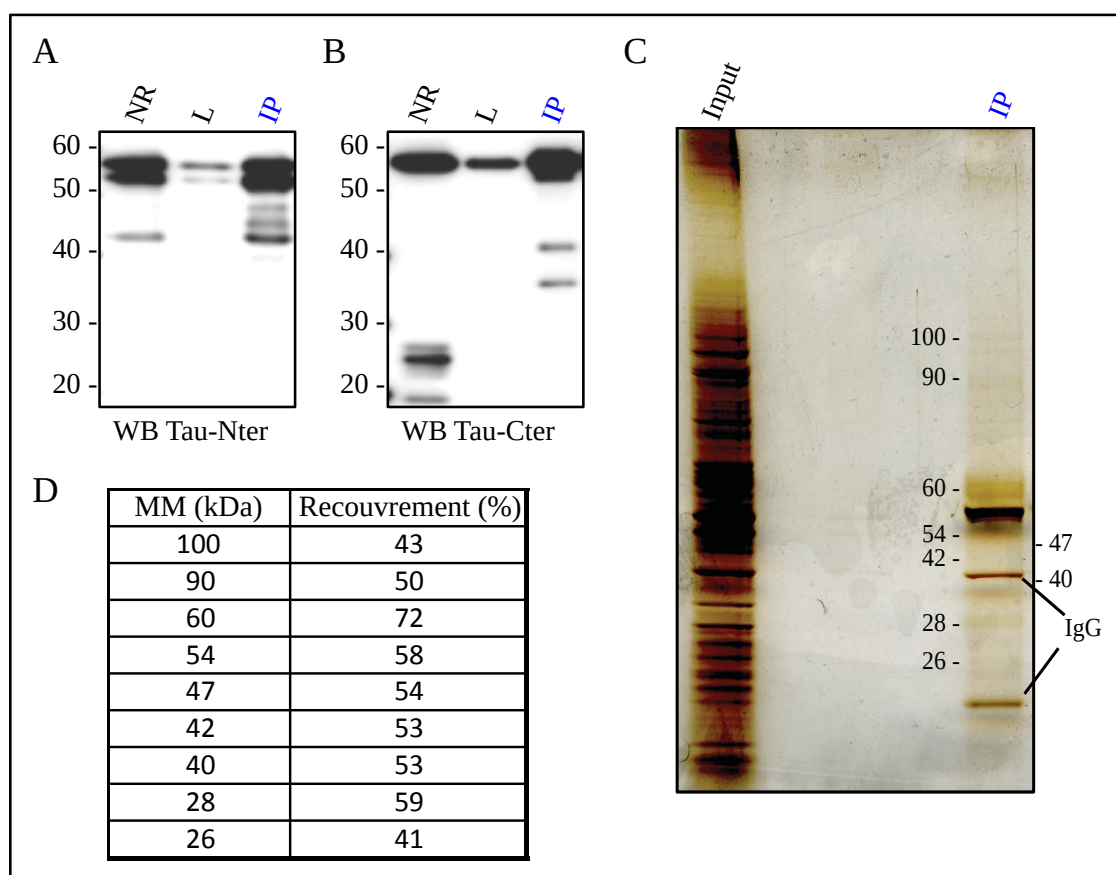


Figure 32: Caractérisation par WB et par LC-MS/MS après coloration à l'argent des produits d'IP de Tau surexprimée dans la lignée SH-SY5Y. Immuno-empreintes de la protéine Tau et des fragments de protéolyse de Tau après enrichissement par immunoprécipitation avec l'anticorps Tau-5 révélée à l'aides des anticorps Tau-Nter (A) et Tau-Cter (B) dans les fractions NR (non retenue), L (lavage), et IP. (C) Coloration à l'argent d'extraits totaux (Input) de protéines extraites à partir de lysats de cellules SH-SY5Y surexprimant Tau et des produits d'immunoprécipitation (IP) . (D) Tableau des recouvrements de séquences de Tau obtenus après analyses LC-MS/MS de chacune des empreintes argentées (% établi sur l'isoforme 1N4R de Tau).

Ces résultats démontrent que les conditions expérimentales mises au point permettent d'enrichir Tau et ses fragments de troncation et que l'approche est compatible avec des analyses en LC-MS/MS.

II.C Analyses LC-MS/MS

L'analyse LC-MS/MS de la fraction d'IP colorée à l'argent après migration électrophorétique montre que les conditions d'enrichissement des fragments de troncation de Tau sont compatibles avec une approche par SM. De plus, cette coloration à l'argent nous a

permis de caractériser l'ensemble de la fraction d'IP sur gel après migration électrophorétique. Néanmoins, elle n'est pas nécessaire pour la suite notre approche puisque la fraction d'IP peut être directement marquée après élution. Ce marquage consiste à greffer au niveau des fonctions amines primaires un groupe rapporteur. Pour les expériences réalisées à partir du modèle cellulaire, le groupe rapporteur est le dansyl. Les immuno-précipitats marqués ont ensuite été protéolysés. Systématiquement, deux digestions par échantillon sont réalisées en parallèle via l'utilisation de la trypsine et de l'Asp-N. Les peptides générés sont ensuite séparés par chromatographie et analysés par spectrométrie de masse en tandem. Les acquisitions sont traitées avec le logiciel Proteome DiscovererTM qui permet de réaliser des recherches à l'aide du moteur de recherche Mascot. Les données expérimentales sont ensuite confrontées à une banque de donnée ne contenant que la protéine Tau (pour accélérer les analyses relatives uniquement aux peptides de Tau) et une banque de donnée englobant le protéome humain. L'identification se base sur une comparaison entre les spectres expérimentaux et les données théoriques à disposition. Plusieurs expériences indépendantes d'IP suivies du marquage au dansyl et d'analyses LC-MS/MS ont été réalisées afin d'identifier l'acide aminé amino-terminal des fragments de troncation de Tau. **Le bilan de l'ensemble de ces expériences** est présenté sous forme de tableaux.

Les résultats des analyses LC-MS/MS des produits d'IP obtenus à partir de cellules SH-SY5Y surexprimant Tau démontrent l'existence d'une multitude de peptides. Dans nos expériences, un recouvrement de séquence de Tau variant de 85 à 95% était obtenu, environ 350 peptides de Tau ont été détectés, parmi lesquels 38 présentaient une modification amino-terminale dont 18 dansylation (soit 5%). En fonction de la séquence en acides aminés des peptides détectés, nous avons établi une **classification** des différents types de peptides retrouvés:

- Des **peptides tryptiques ou Asp-N qui présentent ou non une dansylation amino-terminale.**
- Des **peptides non tryptiques ou non Asp-N avec ou sans dansylation amino-terminale.**
- Des **peptides présentant une modification amino-terminale autre que la dansylation.**

II.C.1 Les peptides tryptiques et Asp-N amino-dansylés et non amino-dansylés

Les peptides tryptiques se définissent comme des peptides présentant soit un résidu Lys, soit un résidu Arg, au niveau de leur extrémité carboxy-terminale, et l'acide aminé qui précède le résidu amino-terminal dansylé ou non est également une Lys ou une Arg. Les peptides Asp-N se définissent comme des peptides présentant un résidu Asp, dansylé ou non, au niveau de leur extrémité amino-terminale.

Nous allons débiter notre analyse par une série de peptides tryptiques qui présentent tous une dansylation amino-terminale liée à l'étape du marquage, reflétant donc un site de clivage amino-terminal (Tableau 6).

Peptides détectés	Modification (s)	Charges	MH ⁺ (Da)
sGYSSPGsPGTPGSR	N-Term(Dansyl); S8(Phospho)	2	1706,65142
nVKSkiGSTENLK	N-Term(Dansyl); K5(Dansyl)	2	1883,90429
aKTDHGAEIVYk	N-Term(Dansyl); K12(Dansyl)	3	1797,79945
kiETHK	N-Term(Dansyl)	2	988,49246
kLDLSNVQSK	N-Term(Dansyl)	2	1364,68787
aKTDHGAEIVYK	N-Term(Dansyl)	2	1564,74612
sGYSSPGSPGTPGSR	N-Term(Dansyl)	2	1626,68617
dNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSK	N-Term(Dansyl)	3	2683,39319
vTSKcGSLG	N-Term(Dansyl); C5(Carbamidomethyl)	2	1141,501694
kiETHK	N-Term(Dansyl)	2	988,491633
iPAKTPPAP	N-Term(Dansyl)	2	1124,580153
sKIGSTENLK	N-Term(Dansyl)	2	1309,645147
aKTDHGAEIVYK	N-Term(Dansyl)	2	1564,744574
sGYSSPGSPGTPGSR	N-Term(Dansyl)	2	1626,684611
iGSLDNITHVPGGGNK	N-Term(Dansyl)	2	1811,873938
dNIKHVPGGGSVQIVY	N-Term(Dansyl)	2	1915,938499
dQGGYTMHQDQEGDTDAGLK	N-Term(Dansyl)	3	2398,953159
kDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK	N-Term(Dansyl)	3	2527,050064

Tableau 6: Peptides tryptiques amino-dansylés obtenus à partir des produits d'IP de cellules surexprimant la protéine Tau. Les séquences peptidiques présentées ci-dessus présentent un groupement dansyl au niveau amino-terminal (N-Term(Dansyl)) et peuvent être bi- ou tri-chargés. Certains peptides peuvent être phosphorylés (Phospho) ou oxydés par un groupement carbamidométhyle (Carbamidomethyl) lié au protocole expérimental. Les peptides ne possédant pas de résidus lysine ou arginine carboxy-terminaux apparaissent en bleu. Le peptide surligné en bleu est un peptide retrouvé également avec une digestion Asp-N. MH⁺ : masse moléculaire du peptide ionisé.

Potentiellement, tous les résidus dansylés présents au niveau amino-terminal de ces peptides obtenus après digestion à la trypsine sont des sites de clivage. L'analyse basée sur la structure primaire de Tau nous révèle que ces résidus amino-dansylés sont tous précédés par une lysine ou par une arginine (acides aminés ciblés par la trypsine). Ceci ne permet donc pas d'affirmer avec certitude que ces résidus sont des sites de clivage. En effet, bien que la dansylation soit réalisée avant la digestion enzymatique, **nous ne pouvons par exclure que la réaction chimique de dansylation se déroule après la digestion.** Dans ce cas là, les sites ainsi générés seraient donc le reflet d'une protéolyse *in vitro* par action de la trypsine et non *in cellulo* et ils ne seront donc pas retenus dans nos résultats. Il faut également noter que ces peptides

présentent au niveau carboxy-terminal des résidus lysine ou arginine à l'exception de trois d'entre eux (représentés en bleu) suggérant soit une coupure aspécifique de la trypsine soit l'existence d'un site de clivage carboxy-terminal lié à une protéolyse *in cellulo* (Tableau 6).

En parallèle à la digestion par la trypsine, les échantillons d'IP ont été soumis à une protéolyse par l'Asp-N qui engendre des peptides présentant un acide aspartique amino-terminal. L'intérêt d'utiliser deux enzymes en amont de l'analyse protéomique réside dans le fait que Tau est une protéine enrichie en résidus lysine et arginine ce qui conduit à la production de peptides trop petits pour être détectés lors de la digestion à la trypsine. De plus, une double digestion enzymatique va permettre de générer deux profils de digestion différents et de recouper les données afin d'augmenter la pertinence des sites de clivage.

Ainsi, nous avons analysé les peptides Asp-N. De la même façon que les peptides tryptiques, des peptides Asp-N ont été retrouvés amino-dansylés. Tous ces peptides amino-dansylés (non montrés) peuvent traduire une troncation se déroulant dans la cellule ou *in vitro* après l'étape de marquage. Ainsi, ces peptides ne seront pas non plus retenus dans nos résultats.

Enfin, un nombre important de peptides tryptiques et Asp-N non amino-dansylés a été détecté. Ces peptides ne présentent donc aucun intérêt dans le cadre de l'identification du site de clivage amino-terminal des fragments de troncation de Tau.

II.C.2 Les peptides non-tryptiques et non-Asp-N amino-dansylés et non amino-dansylés

Les peptides non tryptiques sont définis comme des peptides dont l'acide aminé qui précède leur résidu amino-terminal, dansylé ou non, n'est ni un résidu Lys, ni un résidu Arg. Les peptides non Asp-N sont définis comme des peptides ne présentant pas de résidu Asp amino-terminal, dansylé ou non.

Lors de l'analyse des peptides, nous n'avons pas retrouvés de peptides non tryptiques ou non Asp-N amino-dansylés. En revanche, nous avons détectés une multitude de peptides non Asp-N non amino-dansylés. (Tableau 7). L'extrémité amino-terminale de tous ces peptides correspond donc un site de clivage potentiel.

Peptides détectés	Modification (s)	Charges	MH+ (Da)
VSASLAKQGL		2	973,56789
EIVYKSPVVSG		2	1177,64662
EEAGIGDTPSLE		2	1217,55391
HQPGGGKVQIINKKL		2	1616,95861
GDTDAGLKESPLQTPTE		2	1758,84081
ESPLQTPTEDGSEEPGSETS		2	2076,86962
GSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKL		3	2271,21972
RIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSG		3	2297,26173
ENAKAKTDHGAIEIVYKSPVVSG		3	2300,18729
IGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL		3	2459,40909
ATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSG		3	2469,34536
SKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL		3	2674,53354
NVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL		3	3015,74302
GAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSG		4	3545,88024
IATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSG		4	4084,20542

Tableau 7 : Liste des peptides non Asp-N obtenus à partir des produits d'IP de cellules surexprimant la protéine Tau. Liste des peptides ne présentant pas de résidu aspartate amino-terminal. De plus, aucun de ces peptides ne présente de dansylation amino-terminale. MH+ : masse moléculaire du peptide ionisé.

De façon intéressante, un ensemble de peptides présentant la même séquence amino-terminale (DNIKHVPGGGSVQI) est retrouvé à la fois dans la liste des peptides tryptiques amino-dansylés et dans la liste des peptides Asp-N non amino-dansylés illustrant l'intérêt de la double digestion ([Tableau 6](#) et [Tableau 8](#)).

DNIKHVPGGGSVQIVYkPV	K17(Dansyl)	3	2240,15094
DNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKc	C28(Carbamidomethyl)	5	3025,61237
DNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKcG	C28(Carbamidomethyl)	4	3082,64175
DNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKcGSLG	C28(Carbamidomethyl)	5	3339,77392
DNIKHVPGGGSVQI		2	1420,75552
DNIKHVPGGGSVQIVY		2	1682,88524
DNIKHVPGGGSVQIVYKPV		3	2122,12934

Tableau 8 : Ensemble de différentes formes d'un peptide généré par la digestion Asp-N présentant la même séquence amino-terminale qu'un peptide obtenu après digestion trypsine. MH+ : masse moléculaire du peptide ionisé.

II.C.3 Les peptides présentant une modification amino-terminale autre que la dansylation

A côté des résidus amino-terminaux dansylés, une vingtaine de peptides ont été retrouvés porteurs de modifications post-traductionnelles amino-terminales qui nécessitent une protéolyse préalable. Les peptides affichant de telles modifications sont listés dans le tableau ci-dessous ([Tableau 9](#)). Deux modifications majeures amino-terminales sont ainsi présentées, il s'agit de la N- α -acétylation et de la pyroglutamylation. La première consiste en un transfert d'un groupement acétyle au niveau du groupe α -aminé du premier acide-aminé protéique (Arnesen, 2011). La pyroglutamylation quant à elle correspond à la cyclisation de résidus

glutamate ou glutamine amino-terminaux en pyroglutamate (Schilling et al., 2008). De façon très intéressante, ces modifications n'ont encore jamais été décrites sur Tau. Leur pertinence physiologique ainsi que leurs plausibles conséquences fonctionnelles seront développées dans la discussion. Après élimination des peptides tryptiques et Asp-N, neuf peptides peuvent donc être retenus comme des peptides représentatifs d'un site de clivage se produisant *in cellulo* (Tableau 9 en gras).

Peptides détectés	Modification (s)	Charges	MH+ (Da)
qEFEVmedHAGTY	N-Term(Gln->pyro-Glu); M6(Oxidation)	2	1554,60661
qEFEVmedHAGTYGLGDR	N-Term(Gln->pyro-Glu); M6(Oxidation)	2	2052,85986
qEFEVMEDH	N-Term(Gln->pyro-Glu)	2	1146,44081
qDQEGDTDAGLK	N-Term(Gln->pyro-Glu)	2	1259,53920
qEFEVMEDHAGT	N-Term(Gln->pyro-Glu)	2	1375,54703
qEFEVMEDHAGTY	N-Term(Gln->pyro-Glu)	2	1538,60965
qEFEVMEDHAGTYGLGDR	N-Term(Gln->pyro-Glu)	2	2036,86451
mEDHAGTYGLGDR	N-Term(Acetyl); M1(Oxidation)	2	1479,61597
mEDHAGTYGLGDR	N-Term(Acetyl)	2	1463,62079
eDHAGTYGLGDR	N-Term(Glu->pyro-Glu)	2	1272,5593
qEFEVmedHAGTYGLGDR	N-Term(Gln->pyro-Glu); M6(Oxidation)	2	2052,86145
qEFEVmedHAGTYGLGDRK	N-Term(Gln->pyro-Glu); M6(Oxidation)	3	2180,95778
qEFEVMEDHAGTYGLGDR	N-Term(Gln->pyro-Glu)	2	2036,86773
qEFEVMEDHAGTYGLGDRK	N-Term(Gln->pyro-Glu)	3	2164,96172
mEDHAGTYGLGDR	N-Term(Acetyl); M1(Oxidation)	2	1479,61678
gTGSDDKKak	N-Term(Acetyl); K10(Acetyl)	2	1090,53072
aEPRQEFVME	N-Term(Acetyl); M10(Oxidation)	2	1422,62121
aEPRQEFVmedHAGTYGLG	N-Term(Acetyl); M10(Oxidation)	3	2294,00509
aEPRQEFVME	N-Term(Acetyl)	2	1406,62714

Tableau 9: Regroupement des peptides générés par l'Asp-N (en bleu) ou par la trypsine (en noir) obtenus à partir des produits d'IP de cellules surexprimant la protéine Tau et présentant des modifications post-traductionnelles amino-terminales. Certains résidus glutamate et glutamine amino-terminaux sont détectés sous formes de pyroglutamate (pyro-Glu). D'autres acides aminés (méthionine, glycine et alanine) présentent quant à eux une acétylation amino-terminale (N-Term(Acetyl)). En gras, sont présentés les peptides non liés à une coupure trypsine ou Asp-N. MH+ : masse moléculaire du peptide ionisé.

Pour résumer, le modèle cellulaire de surexpression inductible de Tau nous a permis de développer et d'optimiser une approche protéomique afin **d'identifier avec précision le site amino-terminal de fragments de troncation de Tau**. En effet, sur les 350 peptides de Tau détectés lors de nos analyses, nous avons retenus cinq peptides dont l'extrémité amino-terminale ne peut pas résulter d'une digestion enzymatique expérimentale. Il s'agit des résidus **Ala2, Met11, Glu12, Gln33 et Gly134** (Figure 33). Ces résultats obtenus à partir de cellules SH-SY5Y soulèvent plusieurs questions ; ces sites de clivage peuvent-ils être retrouvés dans des conditions physiologiques ? Sont-ils générés *in cellulo* ou dérivent-ils d'une protéolyse se déroulant *in vitro* ?

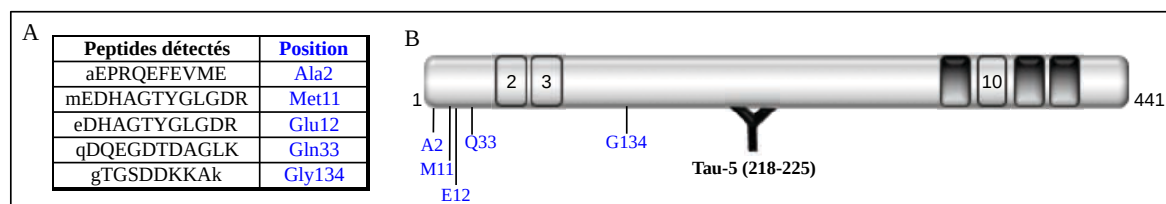


Figure 33: Identification de cinq sites de clivages de Tau à partir d'extraits cellulaires de SH-SY5Y surexprimant Tau. (A) Tableau récapitulatif des peptides fiables dont l'extrémité amino-terminale n'est pas liée à une protéolyse trypsine ou Asp-N dépendante. (B) Représentation de la position des sites de clivages par rapport à l'isoforme de Tau la plus longue et de l'épitope ciblé par Tau-5.

L'approche protéomique étant optimisée et ayant aboutie à l'identification de cinq sites de clivages à partir de la lignée cellulaire, nous avons appliqué notre approche sur des tissus cérébraux humains.

III. Identification de sites de clivage à partir de tissus cérébraux humains

III.A Caractérisation de la troncation de Tau à partir de tissus cérébraux humains

Cette caractérisation a pour but d'analyser le profil de troncation de Tau au sein de tissus provenant de plusieurs individus, de différents âges, présentant ou non des DNF typiques de la maladie d'Alzheimer à différents stades de Braak (Braak et al., 2011). Une telle analyse permet d'établir s'il existe une corrélation entre les profils des espèces tronquées de Tau et l'évolution de la pathologie. Cette caractérisation a été réalisée à partir d'une série d'échantillons biologiques humains provenant de la Neurobank de Lille. Les tissus caractérisés ici avaient préalablement fait l'objet d'études immuno-histochimiques afin de déterminer si les tissus présentaient des lésions histopathologiques et de les classer en fonction de l'atteinte corticale selon les stades de Braak (Braak et al., 2011) (Tableau 9).

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 O	SB O	SB O	SB O	SB O	SB II	SB IV	SB V	SB V	SB VI	SB VI

Tableau 9 : Tableau exposant quelques caractéristiques propres aux échantillons de tissus cérébraux humains utilisés pour cette étude. Sont présentés l'âge de décès des individus, le délai post-mortem (PM) et l'étendue des lésions neuronales de type DNF selon la classification de Braak et Braak.

La même caractérisation immunologique réalisée au sein des cellules SH-SY5Y basée sur l'utilisation des anticorps Tau-Nter et Tau-Cter en WB a été appliquée sur des protéines

extraites à partir de cortex frontal de six individus ne présentant aucune lésion de type DNF et de six patients présentant différents stades de Braak (Figure 34). Les résultats de l'analyse par WB, via les anticorps Tau-Nter (Figure 34A) et Tau-Cter (Figure 34B) précédemment utilisés, montrent le profil électrophorétique caractéristique des protéines Tau retrouvées en conditions physiologiques et dans la MA, selon la classification biochimique des Tauopathies (Delacourte et al., 1999; Sergeant et al., 2008). Ce profil présente trois bandes majeures, de masses moléculaires comprises entre 48 et 65 kDa, qui correspondent à l'immuno-réactivité des différentes isoformes de la protéine Tau selon leur état de phosphorylation. De façon globale, les niveaux d'expression des protéines Tau intactes sont très variables d'un individu à un autre.

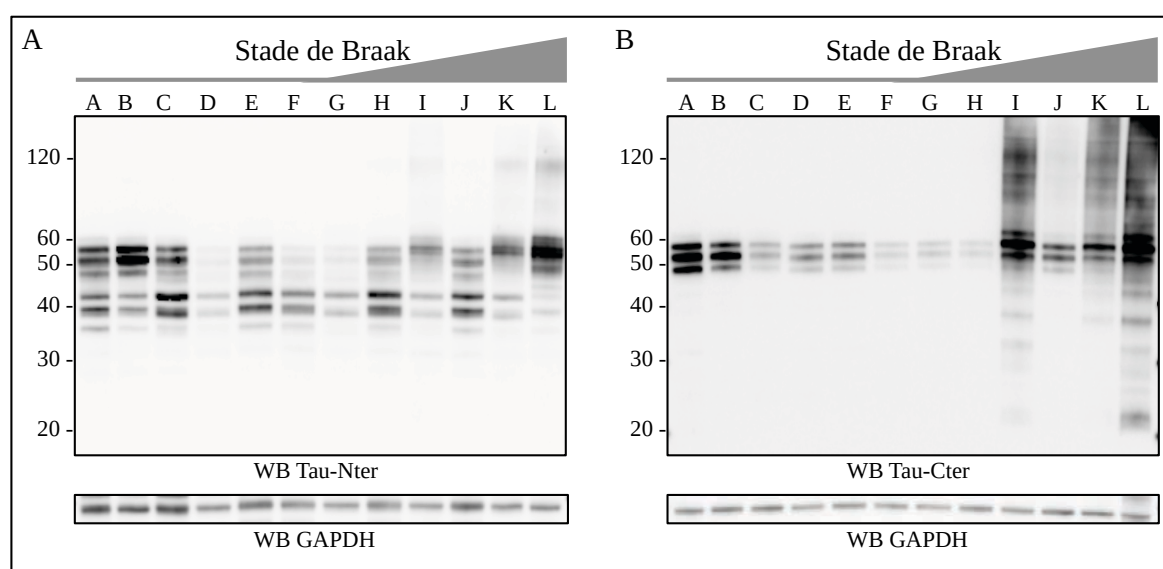


Figure 34 : Caractérisation par WB du profil de troncation de Tau au sein de cortex frontal humain d'individus présentant différents stades de Braak. 10µg de protéines extraites de cortex frontaux provenant d'individus ne présentant aucune lésion de type DNF (A-F) ou présentant des lésions de type DNF dans la distribution a été analysée et classée en fonction des stades de Braak (G-L), ont été déposés sur gel de polyacrylamide et analysés par WB avec les outils immunologiques Tau-Nter (A) et Tau-Cter (B). La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

Au niveau des hauts poids moléculaires, des immuno-empreintes avoisinant les 120 kDa sont observables dans les stades de Braak les plus avancés (patients I, K et L) avec l'anticorps Tau-Nter (Figure 34A). Ces espèces de Tau sont vraisemblablement des dimères de Tau résistants aux conditions réductrices de l'expérience. Les traînées de haut poids moléculaires visibles avec l'anticorps Tau-Cter (Figure 34B) retrouvées chez les individus I, J, K et L correspondent à différentes formes d'oligomérisation de Tau anormalement modifiées. En accord avec d'autres travaux (Sergeant et al., 1997; Watanabe et al., 1999), l'analyse comparative de ces espèces de haut poids moléculaire en confrontant leur abondance avec les anticorps Tau-Nter et Tau-Cter révèle la présence d'espèces carboxy-terminales enrichies au

sein des traînées. Nous pouvons également noter une certaine disparité dans leur abondance et ce, à un même stade de Braak (comparaison des individus I et J, tous deux stades V). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au stade V de Braak, le cortex frontal n'est pas encore systématiquement atteint par la pathologie Tau. Pour rappel, les stades de Braaks sont classés de I à VI, les stades I et II sont marqués par un envahissement de la DNF dans le locus cereleus et la région trans-entorhinal. Une atteinte de l'hippocampe est notée aux stades III-IV. Les stades V et VI dits « isocorticaux » sont les stades les plus sévères avec une atteinte générale de l'isocortex (Figure 11).

La description de la progression spatio-temporelle de la DNF par Delacourte permet d'affiner cette évolution (Delacourte et al., 1999), notamment au niveau des aires corticales. Brièvement, cette classification comporte 10 stades : les stades I et II sont caractérisés par une atteinte progressive du cortex entorhinal. Une atteinte de l'hippocampe marque le stade III. Les stades IV, V et VI sont caractérisés par une atteinte du cortex temporal antérieur et moyen. Au stade VII, la DNF va s'installer simultanément dans toutes les régions corticales associatives (polymodales): le cortex frontal antérieur, le cortex temporal supérieur, le cortex pariétal inférieur. Les stades finaux voient cette progression de la DNF s'étendre jusqu'aux régions corticales primaires visuelles et/ou motrices.

Dans cet exemple là, l'individu I serait à un stade plus avancé que l'individu J selon la classification de Delacourte et ses collaborateurs, pour un stade de Braak identique, qui présenterait une atteinte frontale moins sévère.

Les immuno-empreintes inférieures à 48 kDa correspondent aux fragments de troncation. L'utilisation de l'anticorps Tau-Nter (Figure 34A) révèle l'existence de fragments ayant une masse moléculaire apparente variant de 35 à 45 kDa. Tous les individus caractérisés présentent ces fragments amino-terminaux et leur abondance ne semble pas être corrélée à la sévérité des lésions neuronales. Les fragments carboxy-terminaux de Tau visualisés avec l'anticorps Tau-Cter (Figure 34B) apparaissent quantitativement moins abondants mais qualitativement plus importants. Ces fragments sont principalement visualisés dans les stades de Braak tardifs (patients I-L) et il apparaît clairement que leur abondance est liée à la quantité d'espèces de hauts poids moléculaires présentes. Ceci peut s'expliquer de deux façons ; premièrement ces fragments dériveraient d'une protéolyse des agrégats de Tau ; deuxièmement ces fragments seraient des constituants des agrégats qui seraient solubilisés pendant l'expérience.

Ainsi, cette première caractérisation indique la présence de fragments de troncation de Tau amino- et carboxy-terminaux. Bien qu'une variabilité inter-individuelle demeure, il apparaît

que les fragments amino-terminaux soient présents dans chacun des individus caractérisés aux différents stades de Braak. A l'inverse, les espèces carboxy-terminales semblent être plus abondantes aux stades les plus avancés suggèrent une association avec la pathologie. Des fragments carboxy-terminaux peuvent également être détecté chez certains individus ne présentant aucune lésion de type DNF lors d'expositions prolongées (Figure 35).

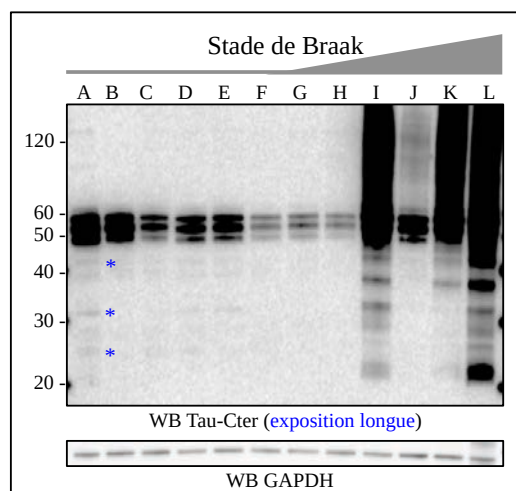


Figure 35 : Caractérisation par WB du profil de troncation de Tau au sein de cortex frontaux humains d'individus présentant différents stades de Braak. 10 μ G de protéines extraites de cortex frontaux provenant d'individus ne présentant aucune lésion de type DNF (A-F) ou présentant des lésions de type DNF dont la distribution a été analysée et classée en fonction des stades de Braak (G-L) ont été déposés sur gel de polyacrylamide et analysés par WB avec l'anticorps Tau-Cter. L'exposition est volontairement prolongée afin de détecter des fragments indiqués par *. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

Pour les analyses LC-MS/MS, différentes régions corticales provenant d'un ensemble de cinq individus ont été utilisées (Tableau 10).

Cas	Neuropathologie	Cortex	Age	Délai PM (h)
1	Braak O	Frontal	22	24
		Occipital		
2	Braak O	Occipital	26	Non renseigné
3	Braak III	Frontal	82	48
		Occipital		
4	Braak III	Frontal	76	10
		Occipital		
		Pariétal		
		Temporal		
5	Braak VI	Frontal	56	26
		Occipital		

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des échantillons cérébraux humains utilisés pour les analyses LC-MS/MS.

Deux individus ne possèdent aucune lésion de type DNF (cas 1 et 2), deux présentent des lésions étendues jusqu'à l'hippocampe (cas 3 et 4) et un dernier présente les lésions de la MA à un stade tardif (cas 5). En fonction du matériel biologique disponible, deux régions (sauf pour le cas 2), les cortex frontaux et occipitaux, ont été soumises à l'approche protéomique. Nous avons également analysé les cortex frontal, occipital, pariétal et temporal d'un même individu

(cas 4) afin de déterminer si à un stade donné de la pathologie, des sites de clivage étaient présents en fonction de ces régions corticales. Systématiquement, ces tissus ont fait l'objet d'une caractérisation par électrophorèse monodimensionnelle et immuno-empreinte (ensemble des caractérisations non montrées) via l'utilisation des anticorps Tau-Nter et Tau-Cter afin de visualiser les espèces tronquées.

III.B Enrichissement des protéines Tau et de ses fragments par IP

Plusieurs expériences d'IP ont été réalisées à partir de tissus cérébraux (préalablement caractérisés) à l'aide de l'anticorps Tau-5 afin d'enrichir les fragments de protéolyses de Tau. Au total, cinq expériences d'IP indépendantes ont été entreprises sur les régions corticales décrites ci-dessus. Pour chacune d'entre elles, la qualité de l'IP a été vérifiée via l'analyse d'un aliquot de l'éluât par WB. La figure ci-dessous présente une analyse représentative.

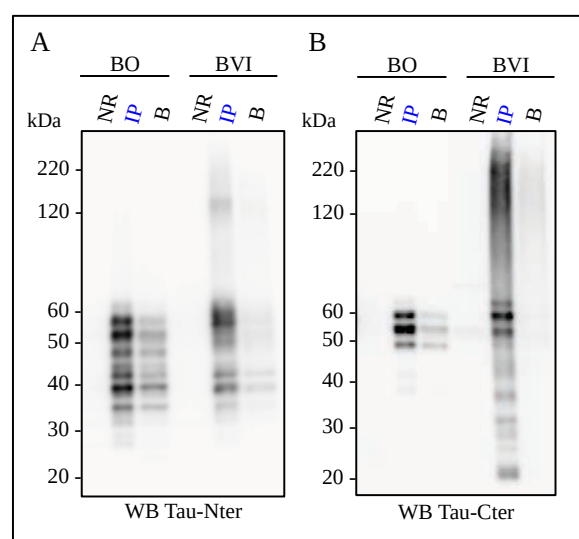


Figure 36 : Analyse représentative par WB d'une immuno-précipitation Tau-5 à partir du cortex frontal d'un individu sain (BO) et d'un patient Alzheimer (BVI). Les immuno-empreintes des protéines Tau entières, tronquées et en complexes sont visualisées par WB à l'aide des anticorps Tau-Nter (A) et Tau-Cter (B) dans les fractions non retenues (NR), IP et B (billes). BO : Braak O, BVI : Braak VI.

Les résultats montrent que l'utilisation de l'anticorps Tau-5 permet d'immunoprécipiter les protéines Tau entières mais également des fragments de protéolyse amino- et carboxy-terminaux (Figure 34). En effet, les immuno-empreintes caractéristiques des six isoformes de Tau sont retrouvées dans la fraction d'IP. Les dimères de Tau de 120 kDa visualisés avec l'anticorps Tau-Nter sont également retrouvés dans cette fraction IP (Figure 34A). De plus, les espèces de Tau de hauts poids moléculaires mis en évidence par l'utilisation de l'anticorps Tau-Cter sont visualisées au sein de la fraction d'IP chez le patient Alzheimer (Figure 34B). Ceci démontre que l'anticorps Tau-5 permet d'enrichir à la fois en protéines Tau entières, mais également, en protéines Tau oligomérisées. De plus, dans nos analyses LC-MS/MS, différents

partenaires protéiques de Tau parmi lesquels Hcs70 (Sarkar et al., 2008) et CHIP (Petrucelli et al., 2004) ont été retrouvés dans cette fraction d'IP supportant les conditions de co-IP (résultats non montrés).

En ce qui concerne les fragments de troncation, l'IP Tau-5 permet d'enrichir les fragments amino- et carboxy-terminaux. De façon surprenante, des fragments carboxy-terminaux de faible masse moléculaire (environ 20 kDa) étant trop petits pour contenir l'épitope reconnu par l'anticorps Tau-5 sont également retrouvés au sein de cette fraction IP. La présence de ces petits fragments dans cette fraction IP pourrait s'expliquer par le fait que ces derniers seraient en complexe avec des partenaires protéiques ou des protéines Tau pendant l'IP. L'utilisation d'agents dénaturants lors de l'électrophorèse les solubiliserait. Une seconde hypothèse à ne pas exclure serait que ces fragments sont générés par une protéolyse *in vitro* de la protéine Tau entière pendant l'IP.

III.C Analyses LC-MS/MS

Les produits d'IP ont donc été soumis au protocole développé précédemment à partir de la lignée cellulaire SH-SY5Y qui nous permis d'identifier cinq acides aminés correspondant à des sites de clivages amino-terminaux, les sites Ala2, Met11, Glu12, Gln33 et Gln134. L'ensemble des résultats de cinq expériences d'IP, de marquage des fonctions amines primaires à la biotine suivi d'une double digestion enzymatique et de l'analyse LC-MS/MS est présenté dans le tableau ci-dessous ([Tableau 11](#)). Seuls les peptides possédant une extrémité amino-terminale non générée par la trypsine ou par l'Asp-N sont représentés. Les résidus amino-terminaux de ces peptides constituent donc des sites candidats de clivage *in situ*. Certains de ces résidus amino-terminaux sont soit marqués à la biotine (N-thio), soit N- α -acétylés ou pyroglutamylés. A l'inverse, certains ne présentent aucune modification amino-terminale. Pour simplifier les résultats, une seule déclinaison par peptide est présentée dans le tableau 11 car dans certains cas, comme celui du peptide présentant le résidu Gln124 en amino-terminal, jusqu'à six formes de peptides différents présentant le même résidu amino-terminal ont été retrouvées. Enfin, dans ce tableau est également indiqué le nombre de fois auquel le peptide et ses déclinaisons ont été détectés au sein du tissu cérébral humain lors des cinq expériences. L'ensemble des résultats des analyses LC-MS/MS est disponible en annexes ([annexe II](#)).

Peptides détectés	Position	Modification amino-terminale	Déclinaisons	Nombre de fois détecté
aEPRQEFEVME	Ala2	N-acétylation	2	2
mEDHAGTYGLGDR	Met11	N-thio	2	2
eDHAGTYGLGDR	Glu12	N-thio	1	2
dHAGTYGLGDR	Asp13	N-thio	1	1
AEEAGIGDTSPSLEDEAAGHVTQAR	Ala103	Aucune	1	2
qARMVSKSK	Gln124	Pyroglu	6	9
MVSKSKDGTGS	Met127	Aucune	1	2
PAkTPPAPK	Pro172	Aucune	1	5
kTPPAPKTPSSGEPPK	Lys174	N-thio	2	7
kKVAVVR	Lys224	N-Thio	1	2
VRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMP	Val229	Aucune	1	1
SAKSRLQTAPVPMP	Ser238	Aucune	2	7
kSRLQTAPVPmP	Lys240	N-thio	2	4
kIGSTENLK	Lys259	Aucune	1	2
gSTENLKHQPGGGK	Gly261	N-thio	1	3
kKLDLSNVQSK	Lys280	N-thio	1	3
VQIVYKPVDSLK	Val306	Aucune	2	6
iVYKPVDSLK	Ile308	N-thio	2	3
vYKPVDSLK	Val309	N-thio	1	2
kPVDLSK	Lys311	N-thio	3	5
DLSKVTSK	Asp314	Aucune	1	1
kPGGGQVEVK	Lys331	N-thio	1	2
EIVYKSPVVSG	Glu391	Aucune	2	13
kSPVVSGDTSPR	Lys395	N-thio	1	10

Tableau 11: Identification des sites de clivage à partir de tissus cérébraux humains. Tableau récapitulatif de l'ensemble des expériences de protéomiques. Les peptides détectés présentent en région amino-terminale la modification liée à la biotinylation (N-thio), une N- α -acétylation, une pyroglutamylation ou aucune modification. En bleu, sont indiqués l'acide aminé amino-terminal du peptide détecté et sa position (numérotation basée sur l'isoforme de Tau la plus longue). Sont également présentés dans ce tableau le nombre de déclinaisons d'un même peptide et le nombre de fois auxquelles ce peptide et ses déclinaisons ont été détectés dans le tissu cérébral humain.

Les sites de clivage identifiés recouvrent l'ensemble de la séquence de Tau ([Figure 37](#)).

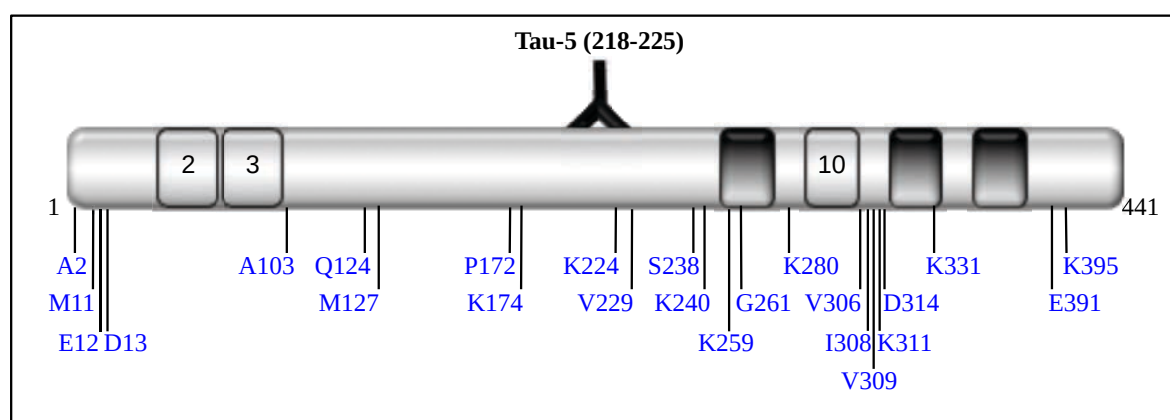


Figure 37 : Distribution des sites de clivages identifiés à partir du tissu cérébral humain. Au total, 24 sites de clivage sont représentés sur l'isoforme de Tau la plus longue.

Comme attendu, des sites sont localisés au sein de peptides appartenant au domaine de Tau en amont de l'épitope reconnu par Tau-5 (218-225). De façon surprenante, de nombreux sites localisés après l'épitope de reconnaissance de Tau-5 sont détectés. Ces sites de clivage appartiendraient vraisemblablement à des fragments de troncation carboxy-terminaux de petites masses moléculaires co-immunoprécipités.

L'identification de ces sites de clivage à partir de tissus cérébraux humains requiert une validation par une autre approche. Idéalement, le développement d'un outil immunologique spécifique à un site de clivage constitue une approche de choix. Néanmoins, dans le cadre de cette thèse, une approche plus rapide a été envisagée : la SRM pour « Selected Reaction Monitoring »

III.D Vers la validation des sites de clivage *in situ*

Déterminer si un site de clivage était spécifiquement retrouvé en conditions pathologiques ou physiologiques et s'il existe une corrélation entre l'apparition d'un site de clivage et l'avancée de la pathologie Tau dans les régions corticales, comme c'est le cas pour les espèces tronquées Glu391 et Asp421 (Basurto-Islas et al., 2008), constituaient des finalités de ce travail. Malheureusement, l'approche protéomique développée ne permet, ni d'exclure la l'absence d'un site de clivage s'il n'est pas détecté au sein d'un tissu cérébral donné, ni d'estimer l'abondance d'un site de clivage lorsqu'il est détecté. De plus, dans le but d'obtenir des résultats quantitatifs reproductibles, il est nécessaire d'éviter les étapes d'IP et de marquages.

Une des approches pour contourner ces limites est la SRM, une approche protéomique quantitative. Grâce à l'utilisation de peptides isotopiques standards conçus à l'aide des précédentes analyses en LC-MS/MS ; il est possible avec la SRM de détecter et de quantifier, dans un milieu complexe comme le tissu cérébral ou le liquide cébrospinal, les peptides dont l'acide aminé amino-terminal reflète un site de clivage de Tau. En effet, la SRM est capable de détecter sélectivement le peptide présent au sein d'un milieu complexe qui possède la même séquence peptidique qu'un peptide isotopique standard (Picotti and Aebersold, 2012; Law and Lim, 2013). Cette approche devrait, en théorie, nous renseigner quant à l'abondance relative d'un peptide dont l'acide aminé amino-terminal reflète un site de clivage de Tau au sein des tissus cérébraux, sans passer par l'IP ni par l'étape de marquage.

Des mises au point de cette approche ont été entreprises dans le cadre de notre étude afin de **confirmer les sites de clivage**, et *in fine*, de **quantifier l'abondance relative d'un peptide**

dont l'acide aminé amino-terminal est un site de clivage. L'utilisation de peptides isotopiques standards a nécessité un ensemble de mise au points (non montrées) afin d'établir le seuil de détection minimal de chacun des peptides isotopiques. Parmi les vingt quatre sites identifiés, nous avons débuté notre analyse par six sites, Met11, Glu12, Gln124, Val229, Gly261 et Glu391, dont les séquences peptiques identifiées en LC-MS/MS ont servi de base pour synthétiser les peptides isotopiques standards représentés ci-dessous (Figure 38A).

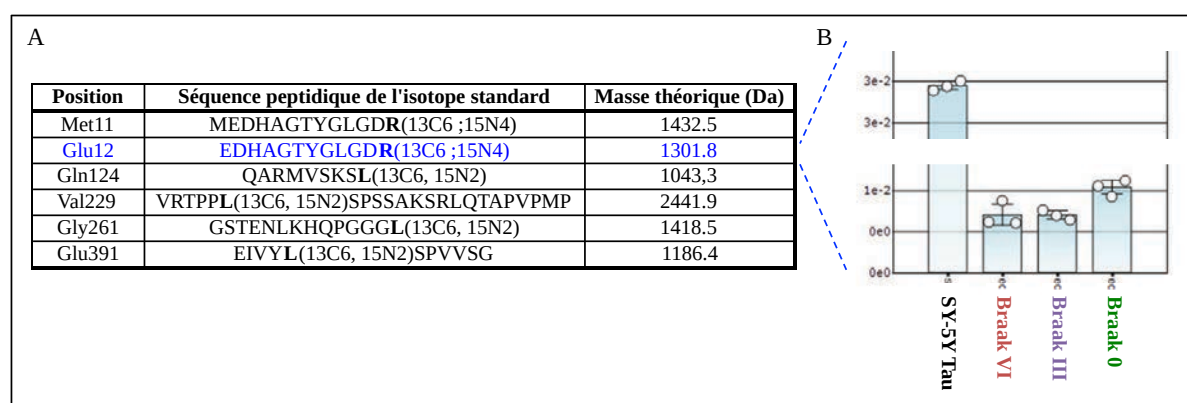


Figure 38 : Séquences des peptides synthétiques utilisés pour les analyses SRM et abondance relative du peptide EDHAGTYGLGDR au sein de tissu cérébral humain et de cellules surexprimant Tau. (A) Tableau présentant les six peptides isotopiques, la position du résidu amino-terminal le composant (numérotation basée sur l'isoforme de Tau la plus longue), et sa masse théorique en Da. En gras, sont marqués les acides aminés isotopiques au carbone 13 ou à l'azote 15. (B) Abondance relative du peptide EDHAGTYGLGDR, traduisant une troncation en position Glu12, a été quantifiée, via son isotope standard représenté en bleu dans le tableau A. n=3 pour chaque échantillon.

Des résultats préliminaires ont permis de confirmer la présence des sites Met11 et Glu12 sans IP au sein de différents tissus cérébraux et également du site Glu391. D'autres études en cours se poursuivent sur les autres sites. En exemple, nos résultats préliminaires montrent l'abondance relative du peptide EDHAGTYGLGDR au sein du cortex frontal de patients classés Braak 0, Braak III, Braak VI, et d'un échantillon de cellules SY-SY5Y surexprimant la protéine Tau (Figure 38B).

De façon intéressante, cette quantification relative démontre que le peptide EDHAGTYGLGDR est plus présent au sein de l'individu ne présentant aucune lésion de type DNF en comparaison aux individus classés Braak III et Braak VI, suggérant donc que le site de clivage Glu12 est plus présent chez un individu ne présentant aucune lésion de type DNF. Ces résultats sont toutefois à considérer avec précaution puisque **seul le peptide natif est quantifié**, toutes les formes dérivées de ce peptide auront des caractéristiques physico-chimiques différentes et ne seront pas détectées avec l'utilisation du peptide standard natif. Ainsi, **la même séquence peptidique modifiée par acétylation ou phosphorylation passera**

inaperçue lors de l'analyse biaisant ainsi la quantification. Cette limite est d'ailleurs particulièrement contraignante puisque la phosphorylation de Tau module sa biologie et qu'une dérégulation de la phosphorylation se produit dans la MA. L'outil de la SRM peut toutefois s'avérer intéressant sur des séquences peptidiques non modifiables pour caractériser à grande échelle ces sites de clivage. La meilleure approche, pour valider la présence de sites de clivage au sein de tissus cérébraux humains et pour établir s'il existe une corrélation entre l'abondance d'un site et un stade de la pathologie, reste le **développement d'un anticorps monoclonal dirigé contre le site d'intérêt.** Cette approche a d'ailleurs été utilisée pour identifier et caractériser les sites Glu391 et Asp421 (Novak et al., 1993; Gamblin et al., 2003b; Rissman et al., 2004).

Pour conclure, grâce à l'approche protéomique développée en collaboration avec l'ESPCI, plus d'une vingtaine de sites de clivage ont été identifiés à partir de tissus cérébraux humains. L'approche par SRM nous a permis de valider un certain nombre de ces sites et des études en cours se poursuivent pour valider la présence des autres sites.

L'identification des sites de clivage à partir de tissu cérébral humain constituait le premier objectif de ces travaux de thèse. Cette étape d'identification est un prérequis qui va permettre de générer des outils moléculaires afin de conduire des études fonctionnelles qui constituent le deuxième objectif de cette thèse.

Chapitre 2 : Caractérisation de quatre fragments de Tau et effet sur la dynamique microtubulaire

L'identification de sites précis de clivage de la protéine Tau est un prérequis pour réaliser les études fonctionnelles qui permettront à terme de comprendre quel est l'impact de la génération de ces fragments de troncation sur les différentes propriétés de Tau, qu'il s'agit de ses fonctions, de sa localisation cellulaire ou de sa fibrillogénèse, et les conséquences cellulaires associées. L'approche protéomique que nous avons utilisée a permis d'identifier vingt-quatre sites de clivage, plus précisément l'acide aminé amino-terminal de ces sites de clivage, répartis sur les différents domaines de Tau. En tenant compte de la relation structure-fonction de Tau, chaque site de clivage pourrait potentiellement moduler de façon différente la protéine Tau entière, la localisation cellulaire, les interactions avec d'autres partenaires protéiques et les fonctions des fragments générés. Pour débiter les analyses fonctionnelles, nous avons choisi de caractériser quatre sites de clivage, deux localisés dans la région amino-terminale de Tau, deux localisés dans sa région carboxy-terminale, sachant que l'ensemble des sites identifiés sont potentiellement pertinents. Les sites choisis sont les résidus Met11, Gln124, Val229 et Gly261 (numérotation basée sur l'isoforme de Tau la plus longue). Nous avons entrepris dans ce travail les caractérisations de fragments de troncation débutant avec ces sites, en comparant leur propriété avec celle de la protéine Tau entière.

I. Caractérisation des fragments Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau et Gly261-Tau

I.A Clonage et expression

Afin de caractériser les fragments de Tau choisis, des vecteurs d'expression plasmidiques (plasmide pcDNA3.1) contenant les séquences d'ADNc des fragments et de la protéine Tau intacte ont été développés. Les constructions sont représentées dans la figure ci-dessous ([Figure 39](#)). Les vecteurs d'expression plasmidiques codant pour les fragments ont été construits sur la base de l'une des isoformes majeures de Tau, l'isoforme 1N4R. Les constructions plasmidiques contiennent donc la séquence codante des fragments débutant par une méthionine (codon servant à initier la traduction) quand le premier acide aminé n'est pas une méthionine, sont suivies par le résidu correspondant au site de clivage amino-terminal et se terminent par l'extrémité carboxy-terminale de Tau. Pour la suite de ce manuscrit, la numérotation basée sur

l'isoforme la plus longue sera conservée et les fragments seront désignés par : Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau et Gly261-Tau.

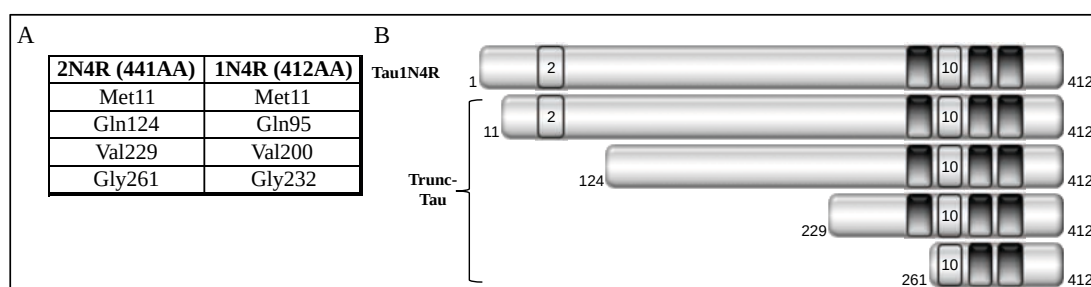


Figure 39 : Nomenclature et représentation schématique des fragments clonés dans le vecteur d'expression pcDNA3.1. (A) : Nomenclature et position des sites de clivages Met11, Gln124, Val229 et Gly261 en fonction des isoformes de Tau 1N4R et 2N4R. La numérotation 2N4R sera conservée pour la suite de ce manuscrit bien que les fragments aient été clonés dans un contexte 1N4R. (B) Représentation schématique de la protéine Tau entière et de ses fragments utilisés dans notre étude.

Des cellules de neuroblastome murin N1E-115 ont été transfectées avec les constructions plasmidiques pendant deux jours et l'expression des fragments a été analysée par WB. Les résultats montrent les immuno-empreintes des quatre fragments aux différentes masses moléculaires apparentes attendues en comparaison avec l'isoforme 1N4R de Tau détectées avec l'anticorps Tau-Cter ([Figure 40](#)).

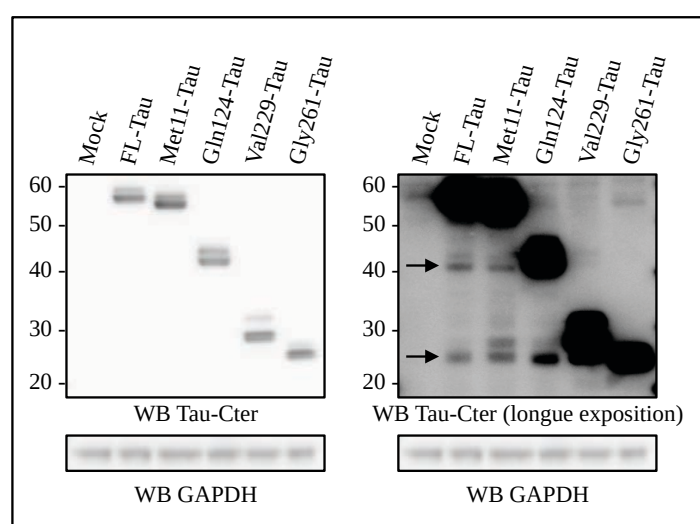


Figure 40 : Analyse représentative de l'expression des fragments par WB en comparaison à la protéine Tau entière (FL-Tau). 10µg de protéines extraites à partir de cellules N1E-115 transfectées avec le vecteur contrôle (Mock), la Tau entière (FL-Tau), et les fragments débutant en Met11, Gln124, Val229, Gly261, pendant 48 heures ont été analysés par WB via l'utilisation de l'anticorps Tau-Cter. Les membranes ont été soumises à un temps d'exposition relativement court et à un temps plus long afin de visualiser les formes tronquées. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge protéique.

Tout comme pour la protéine Tau entière (FL-Tau), les immuno-empreintes des fragments révèlent un retard de migration qui serait lié à l'effet de la phosphorylation, l'immuno-empreinte de hauts poids moléculaires correspondant aux formes les plus phosphorylées et l'immuno-empreinte de bas poids moléculaires aux formes les moins phosphorylées. Il faut

noter ici le retard de migration important des espèces hyper-phosphorylées du fragment Val229-Tau. A plus forte exposition, des produits de catabolisme de la protéine Tau entière sont observés (visibles sur la figure 39 par →). Ces produits de catabolisme présentent la même masse moléculaire apparente de produits de catabolisme des fragments Met11-Tau et Gln124-Tau. Ceci suggère que la protéine Tau entière et ces deux fragments partagent des mécanismes de dégradation communs.

I.B Caractérisation de la phosphorylation

Tau étant une phosphoprotéine (Sergeant et al., 2008), l'un des outils particulièrement adaptés pour étudier sa phosphorylation de façon globale est l'électrophorèse bidimensionnelle (2D). (Figure 41).

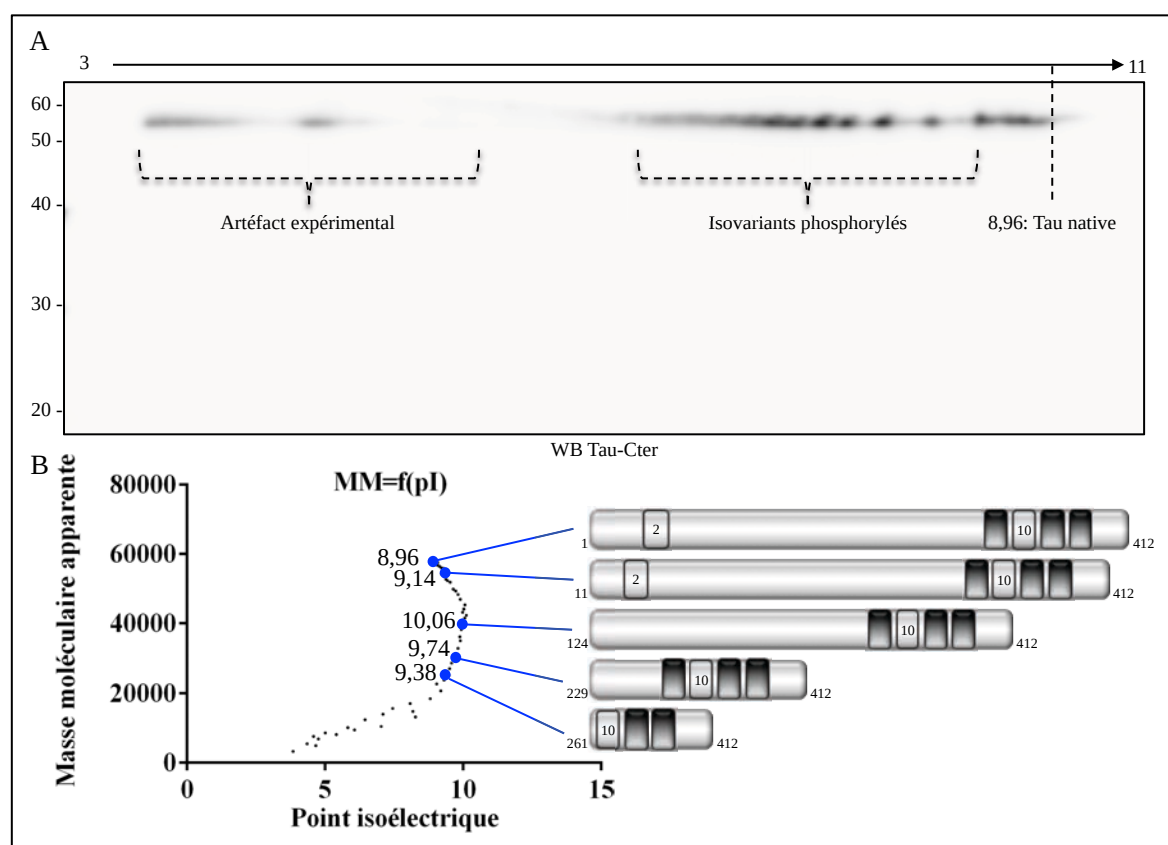


Figure 41: Caractérisation de la protéine Tau par électrophorèse bidimensionnelle. (A) 20µg de protéines extraites à partir de cellules N1E-115 surexprimant Tau ont été analysés en 2D. L'utilisation de l'anticorps Tau-Cter permet de visualiser l'immuno-empreinte présentant des différents isovariants de Tau. (B) Graphique mettant en relation le point isoélectrique de Tau en fonction de sa masse moléculaire. Les points isoélectriques théoriques (obtenus à partir de l'outil Compute pI/Mw d'Expasy) des fragments sont également indiqués sur ce graphique.

Ainsi les extraits protéiques obtenus à partir de cellules qui surexpriment l'isoforme 1N4R de Tau et les fragments ont été analysés en 2D. Dans un premier temps, le profil de la protéine Tau entière a été caractérisé (Figure 41A). La phosphorylation acidifiant la protéine Tau par ajout de charges négatives, les isovariants phosphorylés seront donc déplacés du côté acide. Il faut toutefois noter que même si elle est majeure, la phosphorylation de Tau n'est pas la seule MPT qui va moduler son point isoélectrique des protéines. L'acétylation des lysines par exemple peut également y participer en bloquant la fonction amine primaire des lysines. La troncation progressive du domaine amino-terminal de Tau va logiquement moduler le point isoélectrique de Tau puisque son domaine de projection présente un caractère acide (Figure 41B).

Les résultats d'électrophorèse bidimensionnelle obtenus à partir des cellules N1E-115 qui surexpriment les fragments de Tau montrent que globalement, les isovariants non modifiés de chacun de ces fragments restent basiques (Figure 42).

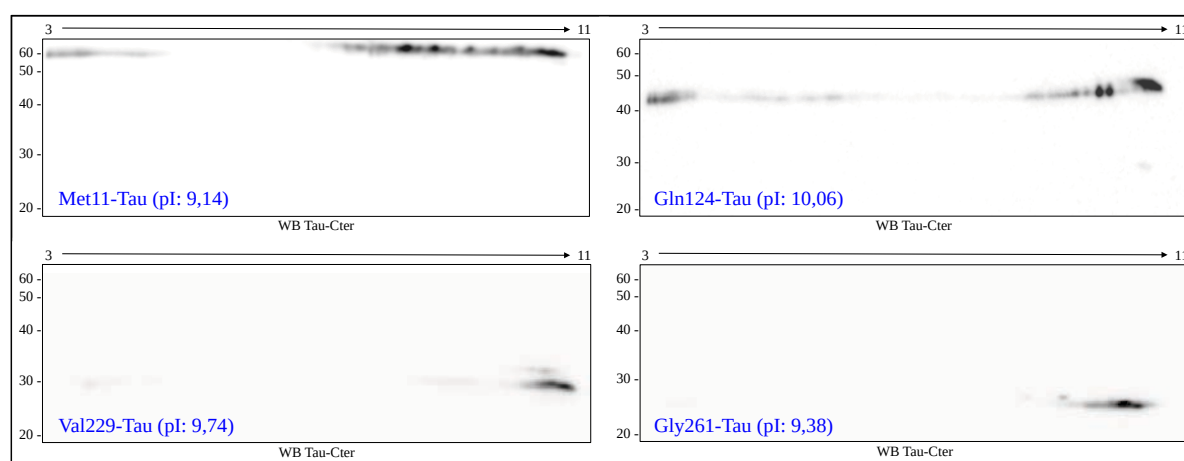


Figure 42 : Caractérisation des fragments de troncation Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau, Gly261-Tau identifiés précédemment par LC-MS/MS par électrophorèse bidimensionnelle. 20µg de protéines extraites à partir de cellules N1E-115 transfectées avec les fragments de troncation Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau et Gly261-Tau, ont été analysés par électrophorèse bidimensionnelle suivie d'un WB révélé avec l'anticorps Tau-Cter. La première dimension a été réalisée sur une strip permettant une séparation des protéines présentant un pI (point isoélectrique) allant de 3 à 11.

Le fragment Met11-Tau et la protéine Tau entière présentent un profil assez similaire et étendu reflétant l'existence de différents isovariants probablement liés à la phosphorylation. Progressivement, la perte du domaine de projection du fragment Gln124-Tau et des domaines riches en proline des fragments Val229-Tau et Gly261-Tau conduit à une concentration des isovariants du côté basique. En ce qui concerne le fragment Val229-Tau, le doublet présentant le shift de masse moléculaire détecté lors des analyses par électrophorèse monodimensionnelle (Figure 40) est également présent. De façon intéressante, ce doublet supérieur présente un

caractère basique, ce qui suggère que la phosphorylation ne serait pas la seule MPT impliquée dans ce shift.

En plus de l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle pour caractériser la phosphorylation globale des fragments, quelques épitopes de phosphorylation distribués sur différents domaines de la protéine Tau ont été étudiés spécifiquement par électrophorèse monodimensionnelle pour compléter cette caractérisation (Figure 43).

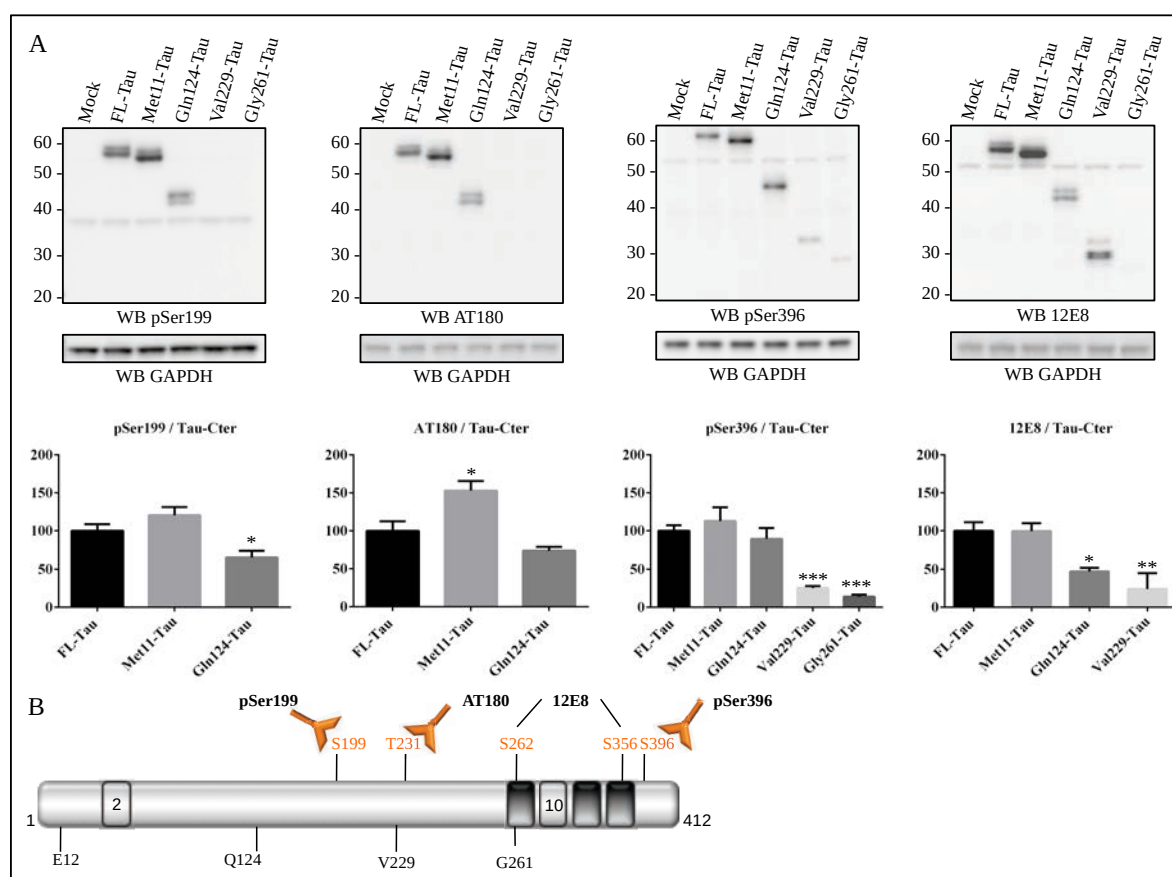


Figure 43 : Caractérisation de la phosphorylation des résidus Ser199, Thr231, Ser396, Ser262 et Ser356 des fragments de troncation et de la protéine Tau entière par WB. (A). 10 µg de protéines extraites à partir de cellules N1E-115 surexprimant Tau et les fragments de troncation ont été utilisés pour analyser par WB le niveau de phosphorylation des épitopes reconnus par les anticorps AT180, pSer199, pSer396 et 12E8. L'immuno-réactivité de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge protéique. Les quantifications en pourcentage du taux de protéines Tau phosphorylées sur chacun des épitopes sont également présentées. Les histogrammes représentent la moyenne des rapports de l'immuno-réactivité des anticorps phospho-Tau sur celle de l'anticorps Tau-Cter. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur type (SEM). N ≥ 3 expériences indépendantes. *: 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. (B). Distribution des sites reconnus par les anticorps utilisés pour cette caractérisation et indication de la position de l'acide aminé amino-terminal des fragments (numérotation basée sur l'isoforme de Tau la plus longue).

Les résultats montrent que chaque fragment présente un profil de phosphorylation distinct en comparaison avec la protéine Tau entière sur quatre épitopes distribués sur différentes régions

de la protéine Tau, Pser199, AT180, pSer396 et 12E8. Il apparaît qu'en comparaison à la protéine intacte, le fragment Met11-Tau est significativement plus phosphorylé sur le résidu Thr231 (reconnu par l'anticorps AT180) ($153\% \pm 16\%$; moyenne par rapport à Tau $\pm$ erreur type). A l'inverse, une forte diminution de la phosphorylation est observée au niveau de la Ser396 pour les fragments Val229-Tau et Gly261-Tau ($25\% \pm 3\%$ pour Val229-Tau, $14\% \pm 3,6\%$ pour Gly261-Tau ; moyenne par rapport à Tau $\pm$ erreur type). En plus de la phosphorylation des résidus Thr231, Ser199 et Ser396, la phosphorylation des sérines Ser262 et Ser356 (reconnues par l'anticorps 12E8) a été étudiée. Les résultats montrent que les fragments Gln124-Tau et Val229-Tau sont significativement moins phosphorylés sur cet épitope en comparaison à la protéine Tau entière ($47\% \pm 6\%$ pour Gln124-Tau, $24\% \pm 27\%$ pour Val229-Tau ; moyenne par rapport à Tau $\pm$ erreur type). La phosphorylation étant l'une des MPT les plus décrites dans la régulation des fonctions de la protéine Tau et dans sa physiopathologie, les différences de phosphorylation sur certains des fragments de troncation pourrait avoir des conséquences fonctionnelles différentes. La phosphorylation des résidus ciblés par 12E8 est connue comme diminuant l'interaction de Tau avec les microtubules (Biernat et al., 1993; Xie et al., 1998). Ces résultats suggèrent donc que ces deux fragments pourraient avoir des caractéristiques différentes de la protéine Tau entière vis-à-vis des microtubules.

II. Effets des fragments Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau et Gly261-Tau sur les microtubules

Les microtubules, assemblage de dimères de sous-unités α et β de tubuline sont des éléments majeurs du cytosquelette, notamment au niveau des neurones, et sont soumis à une instabilité dynamique caractérisée par une phase de polymérisation et une phase de dépolymérisation. Les microtubules subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles dont les conséquences moléculaires ne sont pas encore clairement comprises. Celles-ci pourraient directement moduler ou signer leur état de polymérisation et dépolymérisation. Parmi ces MPT, l'acétylation du résidu Lys40 de l' α -tubuline n'apparaît que sur des microtubules polymérisés, de ce fait, elle est couramment utilisée comme un marqueur moléculaire de leur état de polymérisation (Schulze et al, 1987; Takemura et al., 1992; Perdiz et al., 2011; Al-Bassam and Corbett, 2012). Les différences de phosphorylation des fragments de troncation mises en évidence avec l'anticorps 12E8 nous ont donc conduit à évaluer l'état de polymérisation des microtubules en analysant les niveaux d'acétylation de l' α -tubuline.

II.A Etude des niveaux d'acétylation de l' α -tubuline

Les résultats obtenus par WB à partir de cellules transfectées pendant 48H avec la protéine Tau entière et les différents fragments révèlent des différences dans le niveau d'acétylation de l' α -tubuline. Comme attendu, les cellules surexprimant la protéine Tau entière (FL-Tau) présentent des niveaux d'acétylation de l' α -tubuline plus élevés en comparaison aux cellules qui ne surexpriment pas la protéine Tau entière (Mock) ($46\% \pm 29\%$; moyenne par rapport à Tau $\pm$ erreur type) (Figure 44).

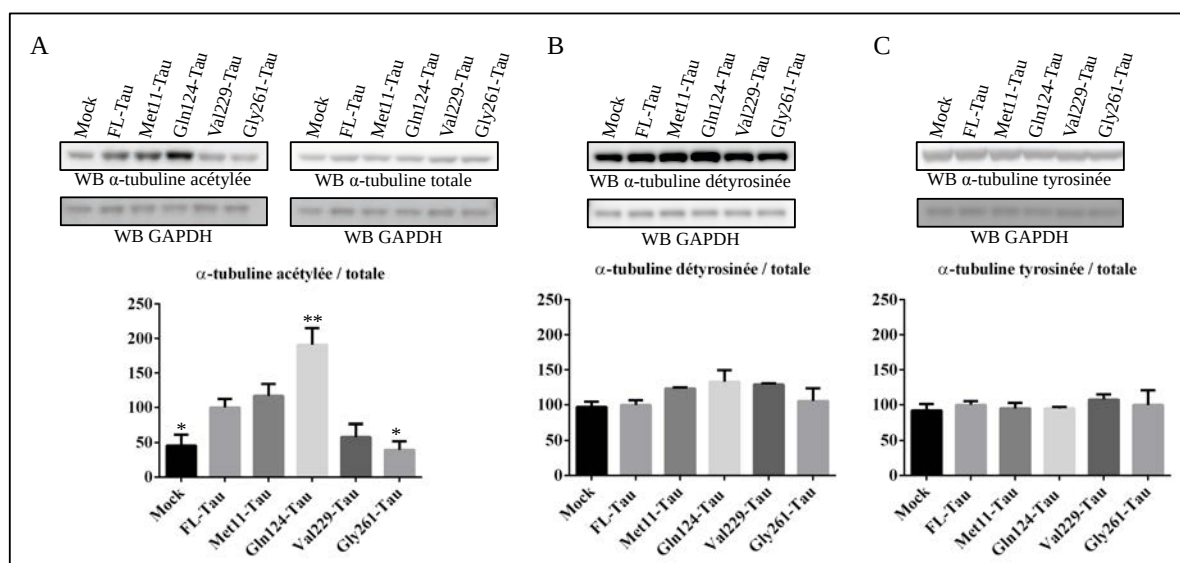


Figure 44: Effet de la surexpression des fragments de troncation de Tau sur les modifications post-traductionnelles de la tubuline. 10 μ g de protéines extraites à partir de cellules N1E-115 surexprimant Tau et les fragments de troncation ont été utilisés pour analyser par WB les niveaux d'acétylation (A), de détyrosination (B) et de tyrosination (C) de l' α -tubuline. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge protéique. Les quantifications en pourcentage du taux de tubuline modifiée rapporté à la tubuline totale dans chacune des conditions sont également présentées. Les histogrammes représentent, à partir d'au moins trois expériences indépendantes, la moyenne des rapports de l'immuno-réactivité de l'anticorps anti-tubuline modifiée sur celle de l'anticorps anti- α -tubuline totale. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type (SEM). $N \geq 3$ expériences indépendantes. *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$. Les différences entre les valeurs moyennes ont été déterminées par une analyse one way ANOVA suivie d'un test post-hoc LDS Fischer.

Pour évaluer l'effet des fragments sur l'acétylation de l' α -tubuline, le niveau d'acétylation de l' α -tubuline des cellules qui surexpriment les fragments a été comparé au niveau d'acétylation de l' α -tubuline des cellules qui surexpriment la protéine Tau entière. Au contraire des cellules surexprimant Tau, une diminution des niveaux d'acétylation est notée au sein des cellules qui surexpriment le fragment Gly261-Tau ($40\% \pm 24\%$; moyenne par rapport à Tau $\pm$ erreur type). Une tendance non significative à la baisse du niveau d'acétylation de l' α -tubuline est notée chez les cellules qui surexpriment le fragment Val229-Tau. Aucune différence n'est

observée chez les cellules qui surexpriment le fragment Met11-Tau. Par contre, et de manière surprenante, l'effet majeur vis-à-vis de l'acétylation de l' α -tubuline est observé lorsque le fragment Gln124-Tau est surexprimé sans modification notable des niveaux d' α -tubuline totale ($191\% \pm 38\%$; moyenne par rapport à Tau $\pm$ erreur type). En outre de l'acétylation, l' α -tubuline est également sujette à d'autres MPT telles que la tyrosination et la détyrosination qui sont également considérées comme des marqueurs de différentes populations microtubulaires (Schulze et al, 1987; Webster et al., 1987; Wloga and Gaertig, 2010). Aucune différence notable n'a pu être mise en évidence sur les niveaux de ces MPT.

En résumé, ces résultats suggèrent que la perte des 123 premiers acides aminés de Tau conduirait à un gain de fonction vis-à-vis des microtubules puisque le fragment Gln124-Tau présente une diminution de la phosphorylation sur un épitope critique pour la liaison aux microtubules (12E8). Cette baisse de phosphorylation est corrélée avec une augmentation de l'acétylation de la tubuline au sein des cellules qui surexpriment ce fragment. Ces résultats ont également été observés au sein d'analyses complémentaires dans d'autres lignées cellulaires : les cellules SH-SY5Y et CHO pour « chinese hamster ovary », lignée cellulaire issue d'ovaire de hamster de Chine (résultats non montrés). Différents mécanismes pourraient être à l'origine de cette différence d'acétylation observée. Le fragment Gln124-Tau pourrait moduler l'expression ou l'activité des enzymes impliquées dans l'acétylation de la tubuline, notamment HDAC6. En effet, il a été montré que l'acétylation de l' α -tubuline est régulée par l'action conjointe des α -tubuline acétyltransférases (α -TAT) et de certaines histones désacétylases (HDACs). Au niveau neuronal, l' α -TAT principale est l' α -TAT1 (Kalebic et al., 2013; Kim et al., 2013) et les protéines HDAC6 et Sirt2 sont impliquées dans la désacétylation de l' α -tubuline (Haggarty et al., 2003; North et al., 2003; Maxwell et al., 2011). Une modulation de leur expression ou de leur activité par le fragment Gln124-Tau pourrait être un des mécanismes à l'origine des différences de niveau d'acétylation de l' α -tubuline observée. De façon intéressante, il existe une interaction entre Tau et HDAC6 (au niveau du domaine de liaison aux microtubules de Tau) et cette interaction modulerait l'activité désacétylase d'HDAC6 (Ding et al, 2008; Perez et al., 2009). Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'effet de la surexpression des fragments de troncation de Tau sur l'expression et l'activité d'HDAC6.

Une deuxième hypothèse peut être émise pour expliquer comment le fragment Gln124-Tau augmente l'acétylation de l' α -tubuline. Comme l'acétylation de l' α -tubuline n'a lieu que sur des microtubules polymérisés et stables, ce fragment Gln124-Tau pourrait favoriser la

polymérisation des microtubules ou les stabiliser, résultant en une hausse d'acétylation de l' α -tubuline.

II.B Expression et activité d'HDAC6, enzyme clé dans la désacétylation de l' α -tubuline

Le kit disponible pour mesurer les activité HDACs ne permet pas de faire la distinction entre l'activité spécifique à HDAC6 et les activités des autres HDACs. Mais comme HDAC6 est la seule protéine de la famille des HDAC à posséder une localisation cellulaire majoritairement cytoplasmique (dYdewalle et al., 2012), un fractionnement permettant de séparer les protéines cytoplasmiques des protéines nucléaires a été réalisé afin de mesurer l'activité d'HDAC6 et également de contrôler son taux d'expression (Figure 45).

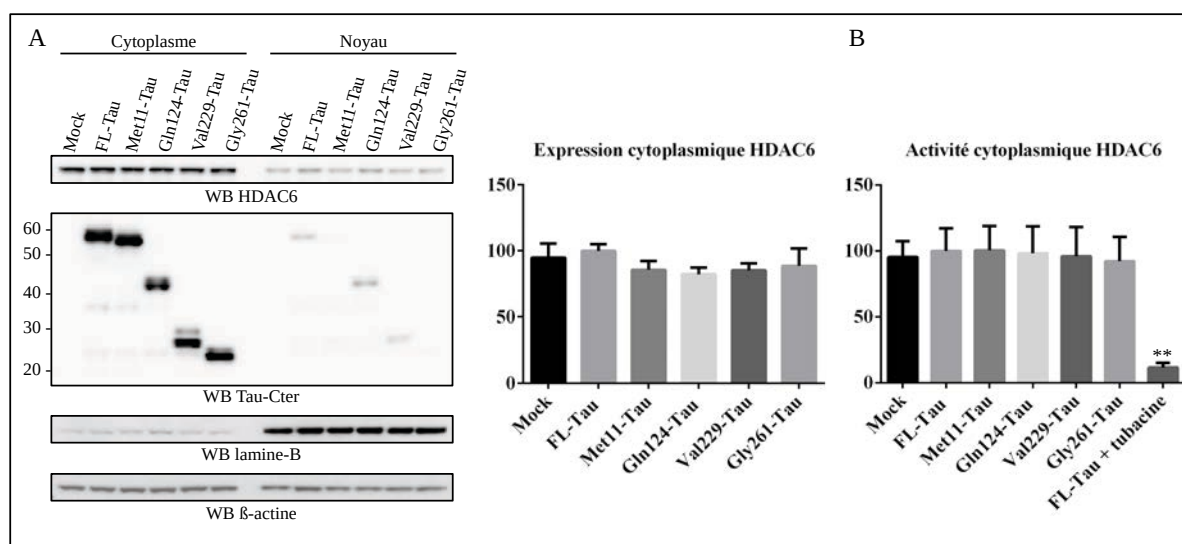


Figure 45 : Effet de la surexpression des fragments de troncation de Tau sur l'expression et l'activité cytoplasmiques d'HDAC6. Des protéines extraites à partir de cellules N1E-115 surexprimant Tau et les fragments de troncation ont été soumises à un fractionnement permettant d'obtenir des fractions cytoplasmiques et nucléaires. La lamine-B sert à contrôler la pureté de la fraction nucléaire. Ce fractionnement a servi pour mesurer l'expression cytoplasmique (A) et l'activité (B) d'HDAC6. Les quantifications en pourcentage du taux d'expression d'HDAC6 rapporté à la β -actine est également présentée. La tubacine, inhibiteur spécifique d'HDAC6, a été utilisée à une concentration de 10 μ M pendant 30 minutes avec un extrait cellulaire et sert de contrôle attestant de la mesure spécifique de l'activité HDAC6. Les histogrammes représentent les moyennes de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur type (SEM). **: $P \leq 0,01$. Les différences entre les valeurs moyennes ont été déterminées par une analyse one way ANOVA suivie d'un test post-hoc LDS Fischer.

Les résultats obtenus à partir des fractions enrichies en protéines cytosoliques et nucléaires provenant de cellules N1E-115 surexprimant les fragments ne montrent aucune différence notable d'expression ou de localisation cellulaire d'HDAC6 en comparaison aux cellules qui surexpriment la protéine Tau entière (Figure 45A). De plus, les mesures d'activité enzymatique

d'HDAC6 cytoplasmique ne révèlent aucune différence (Figure 45B). L'ensemble de ces résultats suggère donc que les différences d'acétylation de l' α -tubuline dans les cellules qui surexpriment le fragment Gln124-Tau ne sont pas liées à une modulation de l'expression ou de l'activité d'HDAC6.

De plus, la distribution d'HDAC6 et de l' α -TAT1 a été analysée dans une fraction microtubulaire et une fraction cytosolique obtenues par fractionnement de cellules N1E-115 exprimant la protéine Tau entière et ses fragments (Figure 46). L'enrichissement en microtubules stables est contrôlé par la présence de formes acétylés de l' α -tubuline reflétant une population enrichie en microtubules stabilisés.

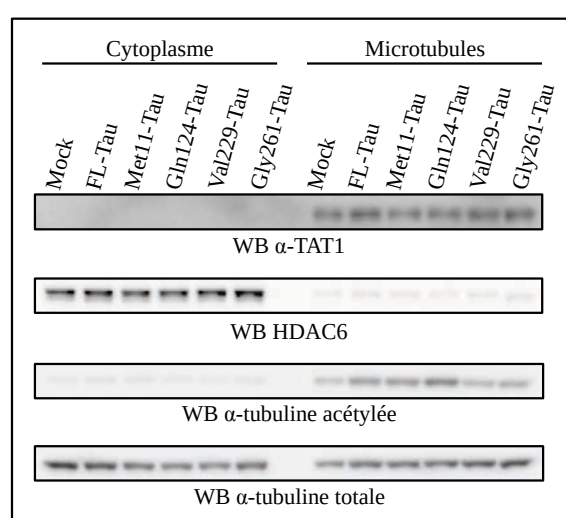


Figure 46 : Distribution d'HDAC6 et d' α -TAT1 au sein de fractions enrichies en protéines microtubulaires ou cytosoliques. Des protéines extraites à partir de cellules N1E-115 surexprimant Tau et les fragments de troncation ont été soumises à un fractionnement permettant d'enrichir en protéines les fractions cytoplasmique et microtubulaire. Les immuno-empreintes d'HDAC6 et d' α -TAT1 sont visualisées par WB. La qualité du fractionnement est vérifiée en analysant la distribution de l' α -tubuline acétylée.

Nos résultats indiquent donc que les différences d'acétylation de la tubuline observées précédemment ne sont pas non plus liées à une délocalisation d'HDAC6 ou de l' α -TAT1. Comme l'acétylation de l' α -tubuline a lieu sur des microtubules polymérisés, une des hypothèses permettant d'expliquer la hausse d'acétylation observée au sein des cellules surexprimant le fragment Gln124-Tau est que ce fragment modulerait la polymérisation et/ou la stabilité des microtubules.

II.C Etude de la polymérisation microtubulaire *in cellulo*

Afin d'étudier si les différences d' α -tubuline acétylée sont corrélées à une différence de polymérisation microtubulaire, un test de polymérisation microtubulaire *in cellulo* basé sur l'utilisation de la cytochalasine-B a été utilisé. La cytochalasine-B est une mycotoxine qui entraîne une cassure du réseau d'actine cortical et permet ainsi aux cellules exprimant une

protéine Tau fonctionnelle de développer des prolongements de type neurites, reflet d'une polymérisation microtubulaire (Leroy et al, 2000).

Les résultats d'imagerie confocale révèlent que le traitement pendant une heure à 20 μ M de cytochalasine B sur les cellules N1E-115 permet d'induire un changement drastique dans le cytosquelette d'actine, qui est mis en évidence par une ponctuation prononcée du marquage immunologique de l'actine (Figure 47A). En outre, un immuno-marquage de l' α -tubuline acétylée démontre que les cellules qui surexpriment Tau traitées à la cytochalasine-B présentent des prolongements neuritiques à l'inverse des cellules non traitées (Figure 47B et C). Ce test valide que nous pouvons suivre la polymérisation microtubulaire au sein de ce modèle cellulaire et nous permettra de déterminer si la surexpression transitoire des fragments module la polymérisation microtubulaire.

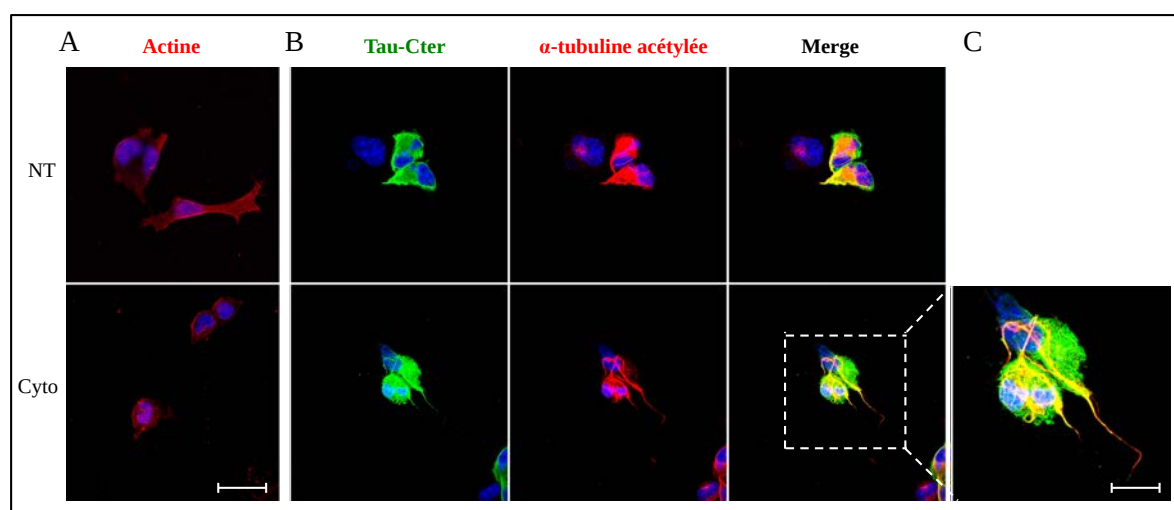


Figure 47: Effet de la surexpression de Tau sur la polymérisation microtubulaire *in cellulo*. Observation par microscopie confocale de cellules N15-115 transfectées pendant 48H avec le vecteur exprimant la protéine Tau entière et traitées ou non à la cytochalasine-B (respectivement Cyto et NT) pendant 20 minutes à 20 μ M. Immuno-marquage (A) ; actine et (B) ; co-marquage Tau-Cter (vert) et α -tubuline acétylée (rouge). Grossissement x40. Echelle : A et B : 50 μ m, C : 20 μ m.

La même analyse a été réalisée au sein des cellules qui surexpriment les fragments et pour affiner cette analyse au sein des cellules N1E-115, le nombre de cellules transfectées qui présentent des extensions neuritiques a été quantifié. Les quantifications montrent que 15% des cellules non traitées et non transfectées présentent des extensions neuritiques. Après traitement à la cytochalasine-B, environ 80% des cellules exprimant la protéine Tau entière, le fragment Met11-Tau ou le fragment Gln124-Tau développent des extensions neuritiques. A l'inverse, un faible pourcentage (variant de 10 à 20 %) des cellules qui surexpriment Tau ou ces fragments

non traitées ou des cellules traitées surexprimant les fragments Val229-Tau et Gly261-Tau développent des prolongement neuritiques (Figure 48A et B).

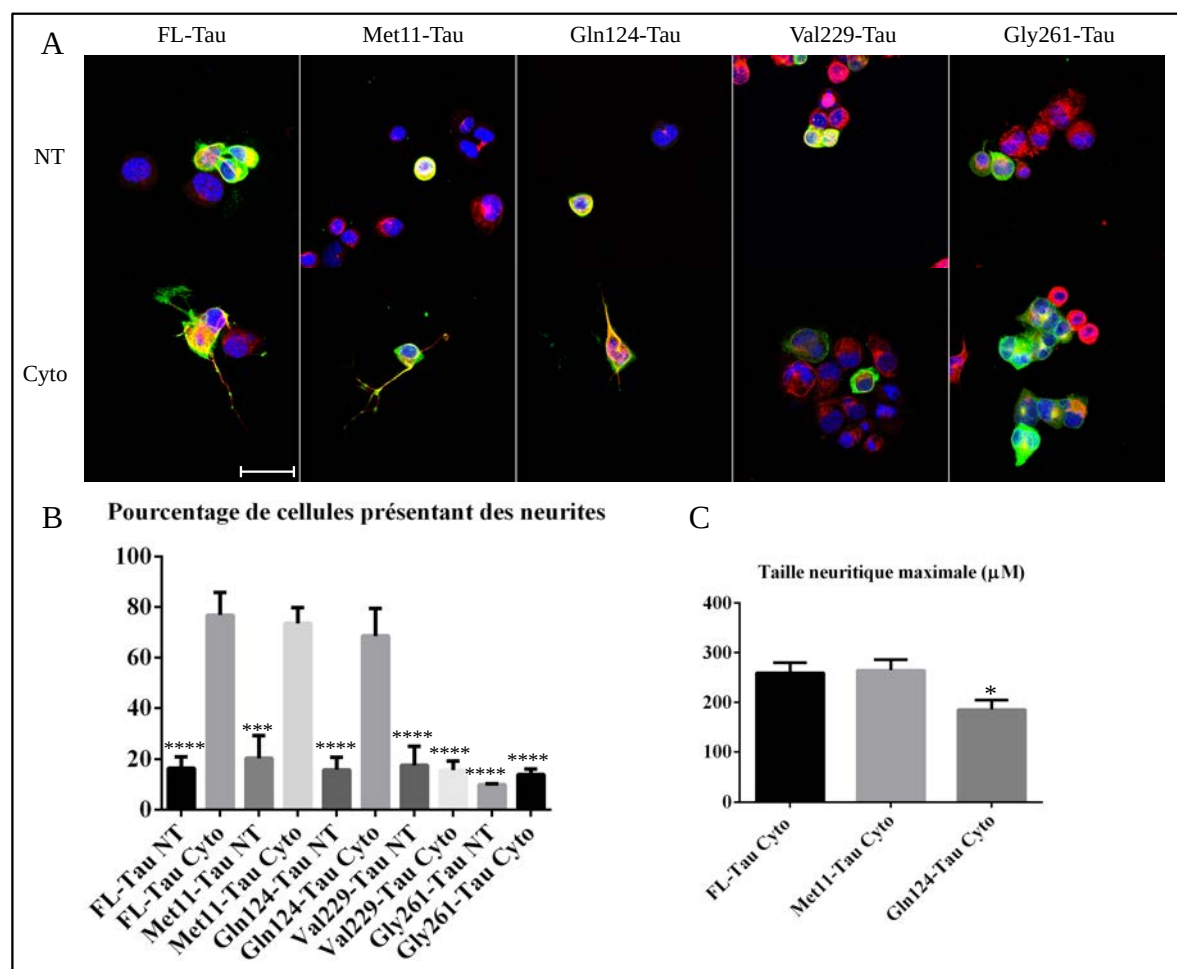


Figure 48 : Effet de la surexpression de la protéine Tau et de ses fragments sur la polymérisation microtubulaire *in cellulo*. (A) Observation par microscopie confocale de cellules N1E-115 transfectées avec le vecteur exprimant la protéine Tau et les fragments de Tau pendant 48H, traitées (cyto) ou non (NT) à la cytochalasine-B pendant 20 minutes à 20μM. Co-marquage Tau-Cter (vert) et α-tubuline acétylée (rouge). Grossissement x40. Echelle : 50 μm. (B) Quantification du rapport du nombre de cellules, traitées ou non, exprimant Tau ou ses fragments et qui présentent des prolongements neuritiques. N ≥ 110 cellules. (C) Quantification de la taille moyenne du plus grand neurite par cellule. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur type (SEM). *: P ≤ 0,05 ; ***: P ≤ 0,001 ; ****: P ≤ 0,0001. Les différences entre les valeurs moyennes ont été déterminées par une analyse one way ANOVA suivie d'un test post-hoc LDS Fischer.

Afin d'évaluer si la protéine Tau entière, les fragments Met11-Tau et Gln124-Tau modulent la vitesse de la polymérisation des microtubules, la taille maximale des neurites développés par les cellules a été mesurée. De façon surprenante, la longueur de l'extension de la taille des neurites est plus faible au sein des cellules qui surexpriment le fragment Gln124-Tau (186μM ±

46 μ M) en comparaison aux cellules qui surexpriment Tau (260 μ M $\pm$ 60 μ M) ou le fragment Met11-Tau (257 μ M $\pm$ 70 μ M) (Figure 48C).

Ces résultats démontrent donc que les cellules qui surexpriment la protéine Tau, les fragments Met11-Tau et Gln124-Tau développent des prolongements neuritiques sous traitement à la cytochalasine-B, attestant de leur fonctionnalité vis-à-vis de la polymérisation microtubulaire. Les cellules qui surexpriment les fragments Val229-Tau et Gly261-Tau présentent une capacité quasi-nulle à polymériser les microtubules. Ceci indique donc que le domaine compris entre les acides aminés 124 et 229, probablement le domaine riche en prolines, est nécessaire à la polymérisation microtubulaire. Toutefois, des différences qualitatives sont notées puisque la longueur de l'extension de la taille des neurites est plus faible au sein des cellules qui surexpriment le fragment Gln124-Tau.

Sur la base de cette approche, nous ne pouvons pas établir si il existe une corrélation entre l'augmentation des niveaux d'acétylation de l' α -tubuline au sein des cellules surexprimant le fragment Gln124-Tau et la polymérisation microtubulaire reflétée ici par la taille des extensions neuritiques. Nous avons donc étudié si cette hausse d'acétylation de l' α -tubuline pouvait être corrélée à une stabilité microtubulaire plus importante.

II.D Etude de la distribution cytosolique et microtubulaire et effets sur la stabilité microtubulaire de la protéine Tau entière et de ses fragments

Afin d'étudier si la différence d'acétylation pouvait être le reflet d'une différence de liaison des fragments de Tau aux microtubules, une analyse de leur répartition entre une fraction enrichie en microtubules stables et une fraction enrichie en protéines cytosoliques a été entreprise dans un premier temps à partir d'extraits cellulaires de N1E-115 transfectées avec les vecteurs codant pour la protéine Tau entière et ses fragments (Figure 49).

De la même façon que pour les analyses de la distribution des protéines α -TAT1 et HDAC6, l'enrichissement en microtubules stables est contrôlé par la présence de formes acétylée et détyrosinée de la tubuline dans la fraction microtubulaire, toutes deux reflètes d'une population enrichie en microtubules stabilisés (Wloga and Gaertig, 2010; Al-Bassam and Corbett, 2012). La tubuline totale et sa forme tyrosinée sont présentes dans les deux fractions.

L'immuno-empreinte de Tau révélée par WB avec l'anticorps Tau-Cter révèle que Tau et les fragments de troncation sont présents dans les deux fractions. La quantification de l'immuno-empreinte présente dans la fraction microtubulaire rapportée à la somme des immuno-

empreintes présentes dans les deux fractions révèle une plus forte proportion du fragment Gln124-Tau dans la fraction microtubulaire comparé à la protéine Tau entière ($184\% \pm 33\%$; moyenne par rapport à $\text{Tau} \pm$ erreur standard) (Figure 49B). A l'inverse, les espèces Val229-Tau et Gly261-Tau sont proportionnellement moins présentes au sein de cette fraction microtubulaire. Ceci suggère donc que la perte des 123 premiers acides aminés de Tau confère au fragment Gln124-Tau une capacité de liaison plus importante aux microtubules.

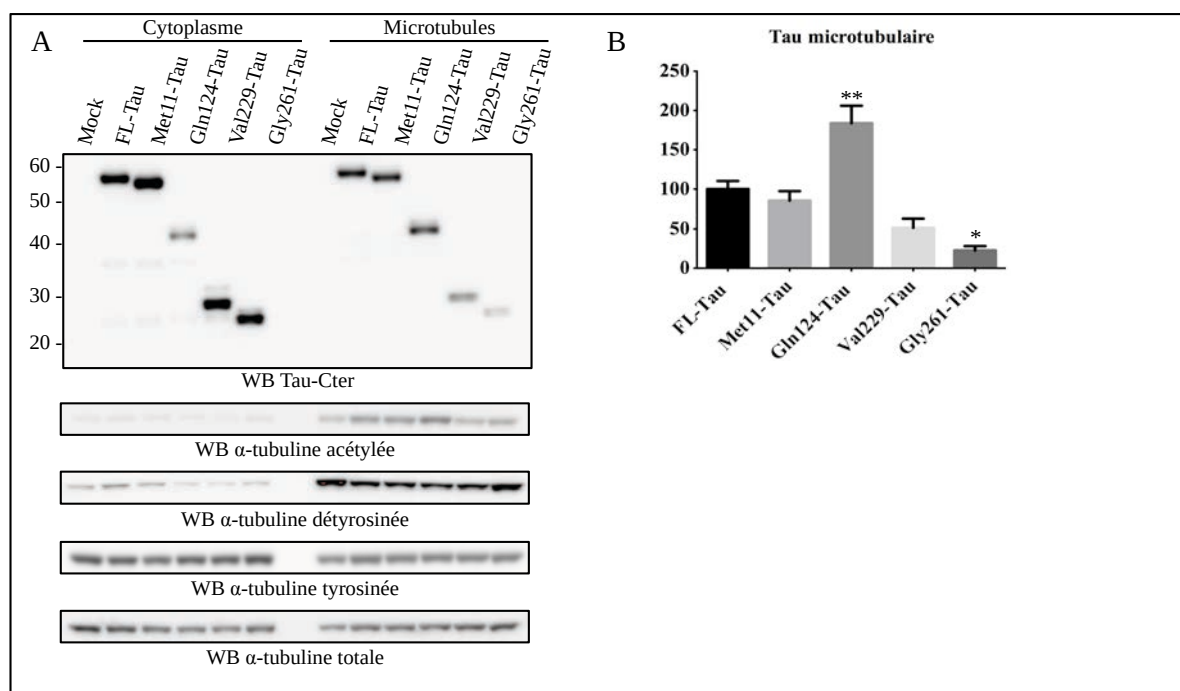


Figure 49 : Distribution microtubulaire et cytoplasmique de la protéine Tau et de ses fragments de troncation. (A) Analyse de la distribution de Tau et des fragments dans une fraction microtubulaire et une fraction cytosolique par WB avec l'anticorps Tau-Cter. La qualité du fractionnement est vérifiée en analysant la distribution de la tubuline acétylée et détyrosinée. (B) Quantification en pourcentage du taux de protéines Tau dans la fraction microtubulaire. Les histogrammes représentent la moyenne des rapports de l'immuno-réactivité de Tau dans la fraction microtubulaire sur celle observée dans la fraction microtubulaire additionnée à celle de la fraction cytosolique. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur type (SEM). * : $P \leq 0,05$; ** : $P \leq 0,01$. Les différences entre les valeurs moyennes ont été déterminées par une analyse one way ANOVA suivie d'un test post-hoc LDS Fischer.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés pour l'acétylation de l' α -tubuline, le fragment Gln124-Tau qui confère une acétylation accrue de l' α -tubuline serait capable de se lier plus fortement aux microtubules. L'ensemble des résultats suggère donc que le fragment Gln124-Tau stabiliserait d'avantage les microtubules en comparaison à la protéine Tau entière. Afin de valider cette hypothèse, nous avons étudié la capacité de ce fragment, du fragment Met11-Tau et de la protéine Tau à protéger les microtubules d'une dépolymérisation induite pharmacologiquement.

La dépolymérisation microtubulaire a été évaluée par l'analyse de l'effet d'un traitement au nocodazole (inducteur d'une dépolymérisation microtubulaire) sur les faisceaux microtubulaires induits suite à la surexpression de la protéine Tau entière et des fragments Met11-Tau et Gln124-Tau. Les résultats d'imagerie confocale montrent que 20 minutes de traitement sont suffisantes pour diminuer fortement la présence des faisceaux de microtubules normalement induits par la surexpression de Tau et du fragment Met11-Tau (Figure 50A). De façon intéressante, cette diminution est beaucoup moins marquée chez les cellules qui surexpriment le fragment Gln124-Tau. Ces résultats suggèrent que ce dernier aurait donc un rôle protecteur vis-à-vis d'une dépolymérisation induite par le nocodazole.

Pour valider ces résultats, un fractionnement microtubulaire a été réalisé et l'effet du traitement au nocodazole sur la dépolymérisation des microtubules a été étudié par l'analyse de la distribution de l'immuno-empreinte de la tubuline totale dans les fractions microtubulaires et cytosoliques. Les résultats montrent que le traitement induit bien une dépolymérisation microtubulaire qui se traduit par une baisse de l'immuno-empreinte de la tubuline totale dans la fraction microtubulaire (Figure 50B). Cependant, les cellules qui surexpriment le fragment Gln124-Tau présentent un niveau de tubuline plus important dans cette fraction microtubulaire en comparaison aux cellules qui surexpriment la protéine Tau entière ou le fragment Met11-Tau. L'analyse de la distribution des immuno-empreintes de Tau par WB montre que la présence de la tubuline totale dans la fraction microtubulaire des cellules traitées au nocodazole est corrélée avec la présence du fragments Gln124-Tau au sein de cette fraction. A l'inverse, l'absence d'immuno-empreintes de la tubuline totale dans la fraction microtubulaire des cellules traitées au nocodazole qui surexpriment le fragment Met11-Tau et la protéine Tau entière est corrélée avec l'absence d'immuno-empreintes du fragment Met11-Tau et de la protéine Tau entière au sein de cette fraction microtubulaire. Ainsi, le fragment Gln124-Tau possède une capacité accrue de protection contre la dépolymérisation induite par le traitement au nocodazole. Ces résultats indiquent donc que ce fragment possède un gain de fonction physiologique vis-à-vis de la régulation de la dynamique microtubulaire.

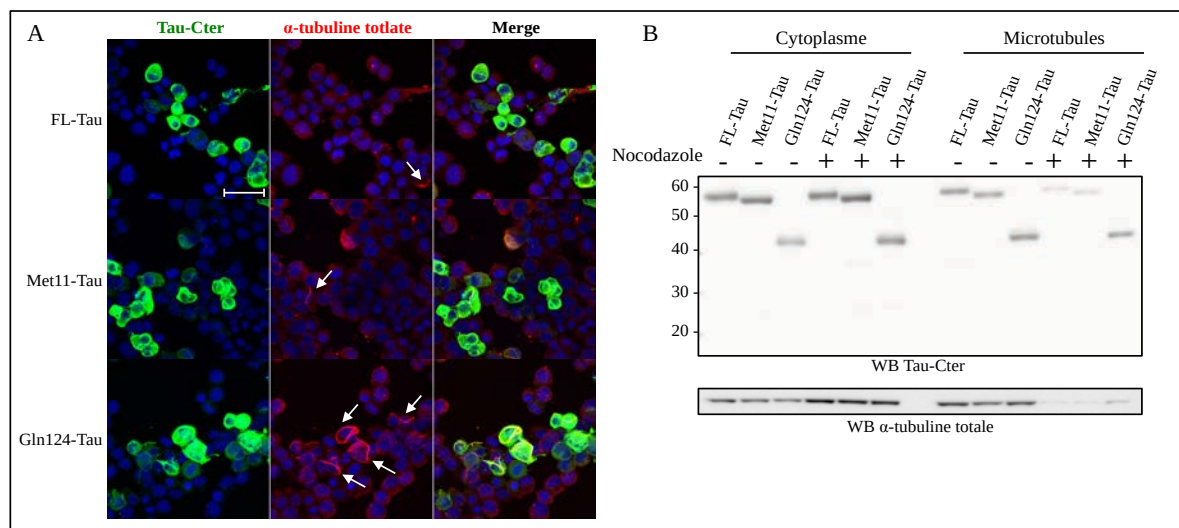


Figure 50 : Etude de la résistance à la dépolymérisation des microtubules *in cellulo*. (A) Observation par microscopie confocale de cellules N1E-115 transfectées avec la protéine Tau ou les fragments pendant 48H et traitées pendant 20 minutes au nocodazole 10μM. Co-marquage Tau-Cter (vert) et α-tubuline totale (rouge). Les faisceaux microtubulaires sont indiqués par une flèche blanche. (B) Etude de la distribution de Tau, des fragments Met11-Tau, Gln124-Tau et de la tubuline totale après fractionnement microtubulaire et traitement au nocodazole pendant 20 minutes. Les immuno-empreintes de Tau et des fragments sont visualisées avec l'anticorps Tau-Cter dans chacune des fractions.

En définitive, nos résultats révèlent l'importance du domaine amino-terminal de Tau dans la stabilisation des microtubules puisque la perte des 123 premiers acides aminés de Tau permet au fragment Gln-124 de résister à la dépolymérisation induite par le nocodazole.

L'ensemble des résultats relatifs à la caractérisation de la troncation de Tau au sein de tissus cérébraux humains, des expériences de protéomiques qui ont abouti à l'identification de vingt quatre sites de clivage chez l'Homme et les résultats sur l'étude des conséquences fonctionnelles des fragments Met11-Tau et Gln124-Tau sur les microtubules ont fait l'objet d'une publication disponible en annexe.

Discussion - Conclusion

Tau est une protéine majoritairement exprimée au sein des neurones dont la fonction la plus étudiée est sa fonction de régulateur de la dynamique des microtubules. Les Tauopathies, parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer est la plus connue, constituent un groupe de maladies neurodégénératives et possèdent comme caractéristique commune de présenter des cellules contenant des protéines Tau agrégées sous formes hyper- et anormalement phosphorylées. Bien que les mécanismes qui conduisent à l'agrégation de Tau, et *in fine*, aux symptômes neurologiques liés au dysfonctionnement neuronal, ne soient pas totalement élucidés, il apparaît que les modifications post-traductionnelles de Tau jouent un rôle important dans les processus qui sous-tendent cette pathologie Tau. Parmi ces MPT, la troncation de Tau serait impliquée dans les mécanismes à l'origine de la pathologie Tau.

Il existe de nombreux fragments de troncation de Tau au sein du tissu cérébral de patients atteint de la MA ou d'autres Tauopathies. L'identité et la fonction de la majorité de ces fragments de troncation de Tau ne sont pas connues. Deux fragments ont été identifiés *in situ*, il s'agit de fragments présentant à leur extrémité carboxy-terminale les résidus Glu391 ou Asp421. Les études fonctionnelles basées sur l'expression de ces fragments de troncation révèlent que ces fragments présentent les caractéristiques d'agents de nucléation capables d'entraîner leur agrégation et celle de la protéine Tau entière. A terme, ceci conduit à la formation de dégénérescence neurofibrillaire, lésion caractéristique de la maladie Alzheimer, à une perte de fonction de la protéine Tau entière, à une mort neuronale et au final, à des troubles cognitifs. Les résultats de ces études ne peuvent être extrapolés à l'ensemble des fragments détectés dans le tissu cérébral de patients atteints de la MA.

Les fragments dont les sites de clivage ne sont pas encore déterminés pourraient présenter diverses propriétés comme la capacité d'être sécrétés dans le liquide cérébro-spinal pour signer la pathologie Tau, ou, à l'instar des deux autres identifiés, avoir un rôle étiologique dans la MA en favorisant l'agrégation de la protéine Tau. La troncation de Tau qui est principalement étudiée dans un contexte pathologique pourrait avoir des fonctions physiologiques comme c'est le cas pour la phosphorylation. Comprendre quelles sont les fonctions de ces fragments est donc d'un intérêt majeur dans la MA et de manière générale dans les Tauopathies. Au delà de leurs intérêts physiopathologiques, identifier ces fragments et les caractériser permettra d'augmenter nos connaissances de la biologie de la protéine Tau. Pour atteindre ces objectifs, la première étape essentielle consiste à identifier ces fragments.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont le premier objectif visait à identifier de nouveaux sites de clivage de Tau à partir de tissus cérébraux humains. Pour cela, nous avons développé une approche protéomique qui nous a permis d'identifier plus d'une

vingtaine de sites de clivage. La première partie de cette discussion sera consacrée à cette approche et aux résultats obtenus. L'identification de l'acide aminé amino-terminal des fragments a permis la génération d'outils moléculaires pour étudier les conséquences fonctionnelles de la troncation vis-à-vis des microtubules. La seconde partie de la discussion sera consacrée aux résultats relatifs aux effets de la surexpression de la protéine Tau entière et de ces fragments dans nos modèles cellulaires sur les microtubules.

I. Identification de nouveaux sites de clivage de la protéine Tau

L'identification de nouveaux sites de clivage de la protéine Tau constituait le premier objectif de cette thèse. Nous avons adapté une approche protéomique qui nous a permis d'identifier cinq sites de clivage à partir de cellules SH-SY5Y qui surexpriment Tau démontrant dans un premier temps la faisabilité de notre approche. La même approche appliquée aux tissus cérébraux humains a abouti à l'identification de vingt quatre sites de clivage de la protéine Tau.

Le but de notre approche expérimentale était d'enrichir par immunoprecipitation les protéines Tau et leurs fragments de troncation pour simplifier le mélange peptidique avant la digestion enzymatique préalable aux analyses LC-MS/MS. Comme il est difficile d'estimer l'abondance des fragments de troncation de Tau par rapport à la protéine intacte, nous avons procédé au marquage de leur extrémité amino-terminale. Ce marquage a permis d'augmenter la détectabilité et d'enrichir par chromatographie d'affinité les différents fragments de troncation de Tau. Il faut toutefois noter que le marquage de la fonction amine primaire amino-terminale n'est pas considéré comme un critère absolu pour valider un site de clivage. En effet, dans nos conditions expérimentales, il apparaît que le rendement du marquage n'est pas de 100% puisque de nombreux peptides ne présentent pas de groupement dansyl ou biotine amino-terminal.

I.A La nature des sites identifiés

I.A.1 Confrontation avec la littérature

Parmi les 24 sites de clivage identifiés chez l'Homme, deux ont été retrouvés au sein de la lignée cellulaire SH-SY5Y surexprimant la protéine Tau. Il s'agit des sites Ala2 et Met11. Le premier site avait déjà été décrit par Hasegawa et ses collaborateurs au sein de tissus cérébraux

d'individus sains et de patients atteints de la MA dans une étude qui s'intéressait à la caractérisation des modifications post-traductionnelles de la protéine Tau par spectrométrie de masse (Hasegawa et al., 1992). A côté de ces sites de clivage, nous avons retrouvé des acides aminés déjà décrits dans la littérature comme sites de clivage, mais à une position différente. En effet, nous avons retrouvé les résidus Asp13 et Glu391 clivés en amino-terminal, impliquant l'existence de fragment qui débutent en Asp13 ou en Glu391, alors que les travaux de Novak et de Binder ont mis en évidence à l'aide d'outils immunologiques l'existence de fragments se terminant par ces résidus Asp13 et Glu391 (Novak et al., 1993; Horowitz et al., 2004).

I.A.2 Localisation des sites identifiés

Sur ces 24 sites, neuf sont localisés en amino-terminal de l'épitope reconnu par l'anticorps d'IP Tau-5 (épitope 218-225) et quinze sont distribués en carboxy-terminal de cet épitope. Ces quinze derniers étant localisés en carboxy-terminal de l'épitope reconnu par Tau-5, les fragments présentant en amino-terminal ces sites ne sont pas censés être directement immunoprécipités par l'anticorps Tau-5. Néanmoins, plusieurs résultats suggèrent que nos conditions expérimentales sont favorables à l'enrichissement des protéines Tau, de ses fragments et d'autres protéines, en complexes :

- Des fragments carboxy-terminaux de masse moléculaire trop faible pour être directement immunoprécipités avec Tau-5 ont été détectés par WB lors de l'analyse de la fraction d'IP ([Figure 36](#))
- Des partenaires protéiques de Tau comme HSC70 ont été retrouvés dans la fraction d'IP dans nos analyses LC-MS/MS.
- Des peptides provenant des régions amino- et carboxy-terminales de Tau dans les analyses du gel coloré à l'argent à des masses moléculaires de 90 et 100 kDa ont été détectés pendant les analyse LC-MS/MS ([Figure 32](#)).

Tous ces résultats permettent d'affirmer que les conditions expérimentales sont favorables à la co-IP et justifient donc la présence d'autant de sites de clivage présentant une fonction amine primaire libre ou marquée, après l'épitope reconnu par Tau-5. Néanmoins, il n'est pas à exclure que ces sites de clivage peuvent être générés par une protéolyse de la protéine Tau entière ou de ses fragments immunoprécipités pendant les expériences de marquage ou d'analyses LC-MS/MS.

I.A.3 N- α -acétylation des sites Ala2 et Gly134

Parmi l'ensemble des peptides détectés pendant nos analyses LC-MS/MS, certains présentaient au niveau de leur extrémité amino-terminale une MPT. Nous avons notamment trouvé les sites Ala2 et Gly134 N- α -acétylés au sein des cellules SH-SY5Y et le site Ala2 N- α -acétylé au sein des tissus cérébraux humains. Cette MPT, irréversible, est fréquemment retrouvée dans les cellules de mammifères puisqu'environ 80% des protéines seraient affectées. Au niveau fonctionnel, cette MPT serait impliquée dans la régulation de la dégradation des protéines, dans leur localisation cellulaire et dans l'interaction avec d'autres partenaires protéiques (Arnesen, 2011). Les enzymes impliquées dans la mise en place de la N- α -acétylation sont les Nats pour « N-terminal α -acétyltransférases ». Celles-ci sont souvent associées avec les complexes ribosomiaux, ce qui suggère que cette modification se produirait de manière co-traductionnelle (Gautschi et al., 2003; Polevoda et al., 2008), ou post-traductionnelle dans le cadre du site Gly134. Ceci implique donc la perte de la méthionine amino-terminale très rapidement par action d'une méthionine amino-peptidase. Déterminer dans quelles proportions la protéine Tau est retrouvée sous forme N- α -acétylée en Ala2 s'avèrera intéressant notamment vis-à-vis de sa stabilité et de sa prise en charge par les systèmes de dégradation. En effet, selon l'acide aminé amino-terminal, les protéines auront une demi vie plus ou moins longue (Hwang et al., 2010; Brower et al., 2013).

I.A.4 Pyroglutamylation des sites Glu12, Gln33 et Gln124

De surcroît, nous avons retrouvé plusieurs peptides débutant en Glu12 et Gln33 au sein des cellules SH-SY5Y, et le site Gln124 au sein de tissus cérébraux humains, présentant un résidu pyroglutamate. Cette MPT consiste en la cyclisation amino-terminale d'un résidu glutamate ou glutamine en pyroglutamate par perte d'une molécule d'eau ou d'ammonium respectivement (Schilling et al., 2008). Parmi ces peptides, celui présentant le résidu Gln124 en amino-terminal a été retrouvé pyroglutamylé. Cette réaction de pyroglutamylation est catalysée par deux enzymes : les glutaminyl-peptides cyclotransférases QPCT et QPCTL (Schilling et al, 2002). Au niveau de leur localisation cellulaire, la première est sécrétée alors que la seconde est associée avec l'appareil de Golgi (Cynis et al, 2008). Physiologiquement, de nombreuses protéines sécrétées présentent cette modification comme l'hormone thyroïdienne (THR), la gastrine, la neurotensine ou encore les chimiokines MCP-1 et MCP-4 (pour monocyte

chemoattractant proteins 1 et 4) (Awadé et al., 1994; Garavelli, 2000). Cette MPT est d'autant plus intéressante qu'elle se produit au sein du peptide A β , le principal composant des dépôts amyloïdes (seconde lésion caractéristique de la MA), favorisant ainsi son agrégation et sa neurotoxicité (Nussbaum et al., 2012; Becker et al., 2013). Néanmoins, il a été montré que cette MPT pouvait se produire spontanément *in vitro* sur des peptides synthétiques (Seifert et al., 2009), il est donc probable que la présence de cette MPT sur certains peptides de Tau soit liée à la procédure expérimentale. En effet, nous avons expérimentalement montré que le traitement d'un peptide synthétique de Tau présentant un résidu glutamate amino-terminal natif (EDHAGTYGLCGC) pouvait être pyroglutamylé dans des conditions expérimentales identiques à celles de l'approche protéomique (résultats en [annexe III](#)). Ces résultats remettent donc en question la formation d'une telle MPT sur le peptide présentant le Gln124 amino-terminal *in situ* et des études supplémentaires sont nécessaires pour établir la pertinence d'une telle modification sur ce fragment. Enfin, même si l'existence *in situ* d'une telle MPT sur ce fragment reste à démontrer, elle requiert la présence d'un résidu glutamate ou glutamine amino-terminal, ce qui implique un clivage capable de générer une telle extrémité amino-terminale.

Pour conclure, l'approche protéomique utilisée dans le cadre de ce travail représente une avancée considérable dans l'identification des fragments de troncation de Tau et constitue la base pour le développement d'outils protéomiques et immunologiques pour caractériser ces sites de clivage au sein d'un plus grand échantillonnage afin de valider leur pertinence biologique et/ou physiopathologique. Néanmoins, l'identification de vingt quatre sites de clivage à partir de tissus cérébraux humains, en utilisant une telle approche, soulève plusieurs questions.

I. B Pouvons nous exclure une troncation *in vitro* ?

L'une des premières limites de notre étude est la question de la troncation *in vitro*. Tau est une protéine non conformée et sensible aux protéases. En effet, il a par ailleurs été déjà montré *in vitro* que Tau était sensible à une multitude de protéases : les caspases, les calpaïnes, les cathepsines, la trypsine, la PSA ou encore le cœur catalytique 20S du protéasome (Hanger and Wray, 2010; Wang et al., 2010a). Notre approche expérimentale ne permet aucunement d'exclure la possibilité d'un clivage de Tau pendant le processus expérimental, et ce, malgré la présence d'inhibiteurs de protéases dans les tampons d'extraction et lors de l'IP dans

l'ensemble de nos expériences. Les seuls sites qui ne sont pas concernés par cette question sont les sites Ala2 et Gly134 qui ont été retrouvés N- α -acétylés. Comme cette modification ne peut se produire spontanément sans l'action d'enzyme, cela implique que la perte de la Met1 pour le site Ala2, ou celle de l'Asp133 pour le site Gly134, a lieu *in situ* et non *in vitro*. En revanche, pour les autres sites, cette troncation *in vitro*, si elle a lieu, pourrait se produire à différentes étapes, que ce soit pendant la lyse protéique, pendant l'IP ou encore pendant les étapes de marquage et de séparation chromatographique.

Parmi les résultats qui soulevaient la question de la troncation *in vitro*, nous avons précédemment observé dans le cadre de la caractérisation des fragments dans les études fonctionnelles, en se basant sur la masse moléculaire apparente, des fragments de protéolyse à forte exposition lorsque les vecteurs codant pour Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau et Gly261-Tau sont transfectés pendant 48H (Figure 40). L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène est vraisemblablement que ces fragments et la protéine Tau entière sont soumis aux mêmes mécanismes de dégradation. La question est de savoir si cette dégradation se produit *in cellulo* ou *in vitro*. Pour y répondre, nous avons tenté d'inactiver les protéases par dénaturation le plus rapidement possible. Des cellules N1E-115 ont été transfectées avec les constructions plasmidiques codant pour les fragments et la protéine Tau entière pendant 48H. Ces cellules ont ensuite été lysées avec du LDS préchauffé à 100°C. Cette lyse en LDS à 100°C a pour but de dénaturer les protéases cellulaires le plus rapidement possible. Les extraits sont ensuite soniqués, et directement déposés sur gel pour analyse par WB du profil de troncation. Les résultats démontrent clairement que même dans ces conditions, des produits de catabolisme des fragments transfectés et de la protéine Tau entière sont visualisés (Figure 51).

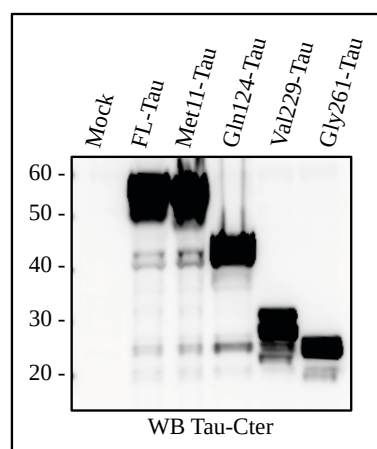


Figure 51: Analyse du profil de troncation de la protéine Tau et de ses fragments en condition de lyse stringente par WB. Des cellules N1E-115 transfectées avec les vecteurs codant pour la protéine Tau entière (FL-Tau) et les fragments de troncation identifiés (Met11-Tau, Gln124-Tau, Val229-Tau, Gly261-Tau) ont été directement lysées avec du LDS préchauffé à 100°C, soniquées, et analysées en WB avec l'anticorps Tau-Cter. L'exposition est volontairement de longue durée afin de détecter les produits de catabolisme des différentes espèces de Tau.

Ceci suggère donc que les fragments générés à partir de la protéine Tau et des fragments Met11-Tau et Gln124-Tau proviennent bien d'une protéolyse se déroulant dans la cellule et non *in vitro*. Bien évidemment, ces résultats n'excluent pas de manière catégorique que les sites de clivage identifiés soient exclusivement liés à une protéolyse cellulaire.

I.C Quel est l'impact du délai post-mortem sur la troncation de Tau ?

Certaines études réalisées à partir de tissus cérébraux humains se sont intéressées à l'impact du délai post-mortem et de la conservation du tissu cérébral sur l'intégrité générale des cellules et de leurs constituants (ADN, ARN, protéines, lipides...) (Crecelius et al., 2008; Ferrer et al., 2008). Au niveau protéique, des événements d'oxydation et de nitration sont produits et peuvent être considérés comme un reflet de l'état général protéique (Chandana et al., 2009). En ce qui concerne la dégradation des protéines, et donc potentiellement la génération de fragments de troncation, celle-ci apparaît comme thermo-dépendante, et se produit dès la première dizaine d'heures (Ferrer et al., 2007). Concernant Tau, il est clairement établi que le délai post-mortem affecte ses modifications post-traductionnelles, notamment son état de phosphorylation. En effet, peu de temps après le décès d'un individu, les protéines Tau solubles sont très rapidement prises en charge par les phosphatases. Vis-à-vis de la dégradation de Tau, une étude basée sur l'analyse biochimique du profil de Tau a été réalisée par WB à partir de cortex de patients atteints de la MA à des stades avancés. Dans cette étude où les tissus sont placés dans des conditions mimant un délai post-mortem, il est montré que le profil des isoformes de Tau, des formes oligomérisées, et des formes tronquées n'est modifié qu'au delà de vingt-six heures (Santpere et al., 2006). Ceci suggère que Tau est une protéine relativement résistante à la dégradation liée au délai post-mortem, à la différence d'autres protéines comme la synucléine (Ferrer et al., 2008).

Quoiqu'il en soit, l'impact du délai post-mortem du tissu cérébral sur la troncation de Tau est une question que nous avons essayé d'aborder à partir d'un modèle murin. L'utilisation d'un tel modèle permet de s'approcher d'un délai post-mortem quasi nul, et donc d'étudier si dans une telle condition, des fragments de troncation sont détectés sur la base de bas poids moléculaires, indépendamment de leur nature. Nous avons donc utilisé un modèle murin de surexpression d'une protéine Tau humaine mutée et leurs contrôles de portées ; le modèle THY-Tau22. Ce modèle présente une pathologie Tau hippocampique progressive avec l'âge, en corrélation avec le déclin cognitif (Schindowski et al., 2006; Van der Jeugd et al., 2013). La

caractérisation biochimique par WB du profil de Tau, dans ce modèle, en fonction de l'âge des souris, permet de mettre en évidence, en plus des formes entières de Tau (totales  et hyper-phosphorylées ) , deux fragments amino-terminaux et tout un panel de fragments carboxy-terminaux. (Figure 52).

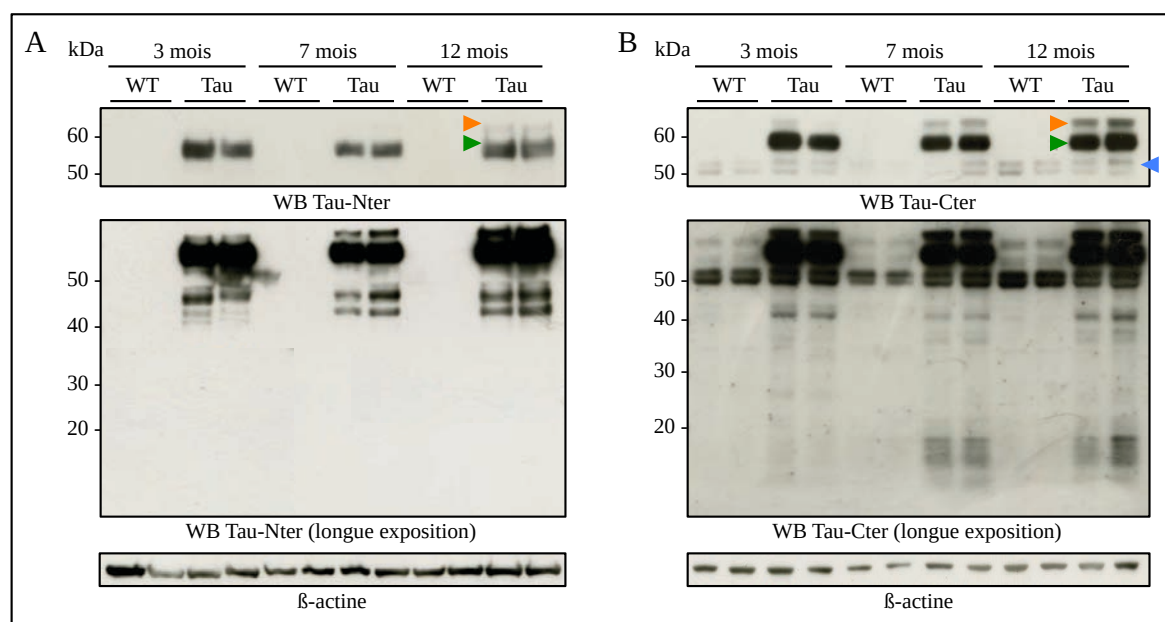


Figure 52 : Troncation de Tau dans le modèle THY-Tau22. 10 μ g de protéines extraites à partir d'hippocampes de souris THY-Tau22 et de leurs contrôles de portés WT âgées de 3, 7 et 12 mois ont été analysés par WB avec les anticorps Tau-Nter (A) et Tau-Cter (B). Sur les cadrans supérieurs, les immuno-empreintes correspondant à la protéine Tau surexprimée dans les souris THY-Tau22 sous forme totales  et hyper-phosphorylée  sont visualisées. L'utilisation de l'anticorps Tau-Cter permet de mettre en évidence la protéine Tau endogène . Afin de visualiser les formes tronquées, les membranes ont été soumises à une exposition plus longue lors de la révélation. La β -actine est utilisée comme contrôle de charge protéique.

Ces résultats mettent donc en évidence sur la base de la masse moléculaire apparente l'existence de fragments de troncation de Tau au sein du tissu cérébral murin, dans lequel le délai post-mortem est quasi nul. Ceci démontre que la troncation de Tau peut survenir indépendamment du délai post-mortem.

I.D La troncation de Tau peut-elle se produire dans des conditions physiologiques ?

Malgré les limites de l'approche protéomique que nous avons développé, nos résultats indiquent **l'existence de sites de clivage de Tau au sein du tissu cérébral humain ne présentant pas de DNF** puisqu'au moins le site Glu12 a été détecté par SRM dans nos analyses préliminaires. De plus, d'autres sites comme les résidus Met11 et Gln124 ont également été détectés au sein de tissus cérébraux humains ne présentant pas de DNF lors des

expériences de marquage et d'analyse LC-MS/MS. Ceci soulève donc la question de savoir si il existe une troncation de Tau en conditions physiologiques.

Dans la littérature, cette question est encore trop peu soulevée, voire jamais. Comme les fragments de troncation ont été découverts au sein de tissus cérébraux de patients atteints de la MA (Wischnik and Novak, 1988; Wischnik et al., 1988), systématiquement, les études portant sur la troncation de Tau sont réalisées dans un contexte pathologique, ce qui mène, peut être à tort, à associer troncation de Tau et pathologie Tau. A l'exception des travaux sur le fragment calpaïne de 17 kDa décrit par les équipes de Ferreira et des Mandelkow qui suggèrent l'existence d'un site de clivage au sein d'individus ne présentant pas de lésions de type DNF (Ferreira and Bigio, 2011; Garg et al., 2011), aucun site de clivage de Tau n'a encore été identifié en conditions physiologiques. De façon générale, les MPT de Tau sont fortement impliquées dans sa biologie. L'exemple le plus courant est celui de la phosphorylation.

En effet, la phosphorylation de Tau module sa biologie et une dérégulation de la phosphorylation de Tau est observée dans les Tauopathies. La phosphorylation de Tau sur les résidus Ser252 et Ser356, ou encore sur les résidus Thr231 et Ser235, est suffisante pour abroger la liaison de Tau aux microtubules (Biernat et al., 1993; Sengupta et al., 1998; Schneider et al., 1999; Fischer et al., 2009). De plus, la phosphorylation est capable physiologiquement de moduler la localisation membranaire ou nucléaire de Tau, ou encore son métabolisme en régulant sa dégradation (Pooler and Hanger, 2010; Pooler et al., 2012; Lu et al., 2014). A l'instar de la phosphorylation, il est tout à fait envisageable que la troncation de Tau puisse moduler toutes ces propriétés en conditions physiologiques, et qu'une dérégulation des activités protéasiques impliquées dans la troncation de Tau participe à la pathologie Tau en formant des fragments qui dérégulent la biologie de Tau et modifient ses propriétés biochimiques.

Dans la MA, Tau est retrouvée sous forme hyper- et anormalement phosphorylée. Nous pouvons imaginer le même type de propriétés appliquées à la troncation. En effet, dans la MA, de la même façon que pour les activités kinases qui sont activées précocement (Lee et al., 1999; Pei et al., 1999; Tseng et al., 2002), des protéases comme les caspases et les calpaïnes présentent une augmentation d'activité (Saito et al., 1993; Grynspan et al., 1997; Dickson, 2004). Ceci pourrait conduire à l'existence de sites de troncation dont l'abondance est augmentée dans la MA en comparaison à une condition physiologique (l'équivalent d'épitopes d'hyperphosphorylation comme pSer396 ou pSer199), ou l'apparition de nouveaux sites de clivage spécifique à un contexte pathologique, comme c'est le cas pour les fragments Asp421

et Glu391 (l'équivalent d'épitope de phosphorylation anormale comme AT100 ou pSer422). Nous pouvons également émettre la possibilité que certains fragments soient physiologiquement rapidement dégradés. Or une défaillance des systèmes de dégradation responsables de l'élimination des fragments en conditions physiologiques conduirait à l'accumulation de ces fragments en conditions pathologiques.

Nos résultats d'analyse LC-MS/MS, de SRM et également, de caractérisation électrophorétique du profil de Tau dans le tissu cérébral humain, mettent en évidence l'existence de sites de clivage au sein de tissus cérébraux humains ne présentant aucune DNF. Ceci amène donc à la question de savoir si cette troncation peut se produire dans un contexte physiologique. Or, il n'existe aucun moyen actuellement pour étudier cette question chez l'Homme dans un contexte physiologique sans se heurter une nouvelle fois à la limite liée au délai post-mortem.

Pour conclure, à ce stade de notre étude, il est difficile de ne pas envisager la possibilité que les sites de clivage identifiés préalablement pourraient être, en partie, générés de façon artéfactuelle (troncation in vitro ou liée au délai post-mortem). Il n'existe aucun moyen de s'affranchir de telles limites à partir de tissus cérébraux humains prélevés post-mortem. L'utilisation de modèles murins et cellulaires s'avère complémentaire pour cette étude, spécifiquement pour aborder les questions du délai post-mortem et de la troncation in vitro.

Néanmoins, notre approche nous a permis d'identifier vingt-quatre sites à partir de cortex humain, dont certains été retrouvés dans un contexte physiologique. **Le développement d'outils immunologiques dirigés contre un site de clivage est le seul moyen pour déterminer d'une part, si un site est spécifique un à contexte neuropathologique ou physiologique, et d'autre part, s'il existe une corrélation entre l'apparition d'un site de clivage avec l'évolution de la pathologie Tau.**

L'identification des sites de clivage de Tau constitue la base pour générer des outils moléculaires afin d'étudier l'impact de la troncation de Tau sur sa biologie et sa physiopathologie. Dans le cadre de ces travaux de thèse, la caractérisation biochimique de certains des fragments identifiés nous a amené à nous intéresser particulièrement à l'effet de la surexpression des quatre fragments de troncation de Tau sur la régulation de la dynamique microtubulaire.

II. Implication du domaine amino-terminal de Tau dans la régulation de la dynamique microtubulaire

L'identification de nouveaux sites de clivage de Tau à partir du tissu cérébral humain a permis la construction de vecteurs plasmidiques afin de conduire des études fonctionnelles pour mieux comprendre l'impact des différents sites de troncation sur la protéine Tau.

Nous avons choisi de focaliser ces premières études fonctionnelles vis-à-vis des microtubules. Les ADNc de quatre fragments de troncation débutant aux résidus Met11, Gln124, Val229 et Gly261, et se terminant à l'extrémité carboxy-terminale de Tau ont été clonés dans des vecteurs d'expression transitoire. Le résultat majeur de cette étude, obtenu à partir d'un modèle cellulaire de surexpression transitoire, suggère que le fragment Gln124-Tau présente un gain de fonction en comparaison à la protéine Tau entière vis-à-vis de cette dynamique microtubulaire et que la région amino-terminale de la protéine Tau aurait un rôle dans la régulation de la dynamique microtubulaire.

II.A Relation structure-fonction des fragments de Tau

L'espèce tronquée débutant au résidu Gln124, positionné dans l'exon 4 de Tau, lorsqu'elle est surexprimée pendant 48h dans les cellules de neuroblastome murin, double les niveaux d'acétylation de l' α -tubuline. Cette modification post-traductionnelle de l' α -tubuline est considérée comme marqueur des microtubules polymérisés (Perdiz et al., 2011). Inversement, les fragments Val229-Tau et Gly261-Tau tendent à abaisser les niveaux d'acétylation de la tubuline. Le fragment Met11-Tau se comporte de la même façon que la protéine Tau entière. En accord avec ces résultats, le fragment Gln124-Tau est préférentiellement distribué dans une fraction enrichie en microtubules, et les fragments Val229-Tau et Gly261-Tau sont moins présents dans cette fraction microtubulaire. De manière intéressante, cette augmentation d'affinité du fragment Gln124-Tau pour les microtubules s'accompagne d'une résistance à la dépolymérisation microtubulaire en comparaison à la protéine Tau entière ou au fragment Met11-Tau.

Ces résultats révèlent donc, de manière intéressante, un effet plutôt inattendu de l'implication du domaine amino-terminal de Tau dans la stabilisation des microtubules. De façon générale, il est largement admis que ce sont les motifs répétés, en combinaison avec les domaines riches en prolines (particulièrement le second domaine P2), les domaines directement

impliqués dans la régulation de la dynamique microtubulaire, puisqu'ils présentent une plus grande affinité pour les microtubules (Himmler et al., 1989; Butner and Kirschner, 1991; Goode and Feinstein, 1994; Goode et al., 1997) (Figure 53). L'**effet direct** de Tau sur les microtubules implique une région englobant les acides aminés 218-358, qui contiennent le second domaine riche en prolines, les motifs répétés (Goode and Feinstein, 1994; Gustke et al., 1994). En accord avec nos résultats, il a été montré *in vitro*, qu'un fragment de Tau tronqué à la fois en amino- et carboxy-terminal (151-391) favorise la polymérisation microtubulaire (Zilka et al., 2006). Par ailleurs, une récente étude *in vitro*, basée sur l'utilisation de fragments de Tau générés par protéolyse limitée, a démontré que le fragment Ser208-Ser324 se lie plus fortement aux microtubules que la protéine Tau entière et favorise leur assemblage (Fauquant et al., 2011).

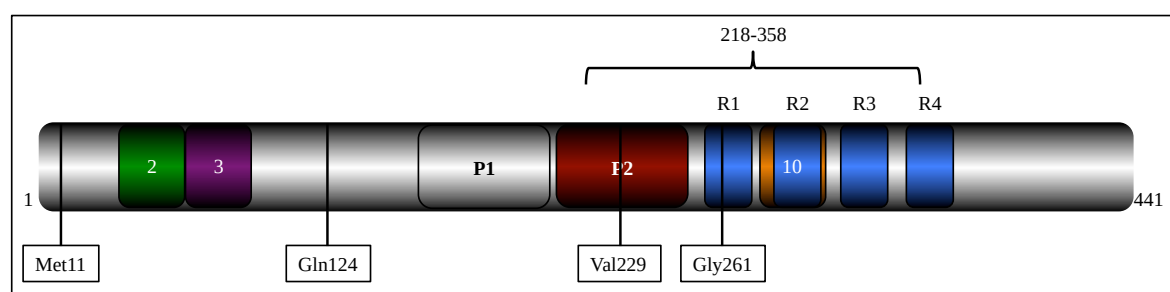


Figure 53 : Représentation schématique de l'isoforme 2N4R de Tau, de la position des acides aminés 218-258 et des sites de clivage Met11, Gln124, Val229 et Gly261. La région 218-358 est la région qui est directement impliquée dans l'interaction de Tau aux microtubules.

En accord avec la séquence de liaison aux microtubules, nous montrons, d'une part, que la surexpression du fragment Val229-Tau, démunie de la première partie du domaine riche en proline P2, ne permet pas d'augmenter les niveaux d'acétylation de la tubuline. D'autre part, d'après nos fractionnements microtubulaires, ce fragment est moins présent dans une fraction enrichie en protéines associées aux microtubules, suggérant une capacité d'interaction moins importante. Ceci démontre l'importance de la première partie du domaine riche en proline P2, et du domaine P1 dans l'acétylation de la tubuline et dans l'interaction de Tau aux microtubules. De plus, la perte de la stabilité microtubulaire, comme l'atteste l'acétylation de l' α -tubuline, est exacerbée par la perte du domaine riche en prolines dans sa totalité et des cinq premiers acides aminés constitutifs du premier domaine de répété R1, comme les résultats relatifs à la surexpression du fragment Gly261-Tau le démontre.

Afin d'approfondir cette relation structure-fonction du fragment Gln124-Tau, il serait intéressant d'étudier si l'absence de l'exon 10 confère toujours ce gain de fonction. En effet, il a été montré *in vitro* que l'augmentation de la polymérisation microtubulaire d'une protéine

Tau4R mutée en amino-terminal était dépendante de la présence de cet exon 10 puisque son homologue 3R muté ne présente pas de capacité de polymérisation accrue (Iyer et al., 2013).

Ainsi, et de façon surprenante, notre étude révèle que la perte par troncation des 123 premiers acides aminés de Tau jouerait un rôle dans sa fonction la plus décrite suggérant une implication direct du domaine amino-terminal de Tau dans cette fonction. Le rôle de ce domaine sur les microtubules a été, quant à lui, reporté comme étant indirect, soit en modulant l'espacement entre les microtubules (Chen et al., 1992), soit en servant d'intermédiaire avec des partenaires protéiques eux même associés aux microtubules (Magnani et al., 2007; Dixit et al., 2008). Néanmoins, d'autres études basées sur la découverte de mutations affectant des résidus amino-terminaux de Tau (Arg5 et Gly55), décrites dans les DTFP-17 et dans la PSP, démontrent qu'une modification dans la composition en acides aminés du domaine amino-terminal de Tau module l'assemblage des microtubules (Hayashi et al., 2002; Poorkaj et al., 2002; Iyer et al., 2013). En effet, l'utilisation de protéines Tau mutées dans l'exons 1 (mutation R5L ou R5H) entraîne une diminution de la polymérisation microtubulaire *in vitro* (Hayashi et al., 2002; Poorkaj et al.,). A l'inverse, l'utilisation d'une protéine Tau mutée dans l'exon 2 (G55R) favorise la polymérisation microtubulaire *in vitro* (Iyer et al., 2013). Ces résultats suggèrent que le domaine amino-terminal de Tau pourrait directement moduler la dynamique des microtubules.

II.B Les mécanismes potentiels qui sous-tendent le gain de fonction du fragment Gln124-Tau

Comme la phosphorylation de Tau sur certains sites impacte sa liaison aux microtubules, une phosphorylation différentielle du fragment Gln124-Tau pourrait expliquer le gain de fonction de ce fragment sur la stabilité microtubulaire. Dans le cadre de ce travail, nous avons entrepris une caractérisation globale et ciblées de la phosphorylation des fragments par électrophorèse mono- et dimensionnelle respectivement. Nous avons montré que le fragment Gln124-Tau voyait sa phosphorylation diminuer sur les résidus Ser262 et Ser356 (reconnus par l'anticorps 12E8 lorsqu'ils sont phosphorylés), localisés respectivement dans le premier et quatrième domaine répété et qui sont critiques pour la liaison de Tau aux microtubules (Biernat et al., 1993; Fischer et al., 2009). Cette diminution de phosphorylation pourrait, au moins en partie, expliquer le fait que ce fragment présente une capacité plus forte à lier les microtubules. Cependant, nos données ne permettent pas d'affirmer si cette diminution de phosphorylation est

une cause ou une conséquence d'une plus forte liaison aux microtubules. Néanmoins, des études *in vitro* basées sur l'utilisation des fragments de Tau recombinants ont démontré qu'indépendamment de sa phosphorylation, le domaine amino-terminal de Tau était capable de moduler la polymérisation microtubulaire (Fauquant et al., 2011).

Une seconde hypothèse, pour expliquer la hausse d'affinité du fragment Gln124-Tau vis-à-vis des microtubules, peut être émise notamment en lien avec les charges, non pas modulées par phosphorylation, mais par la délétion du domaine de projection. Les exons 1, 2, 3 et 4 présentent un caractère acide très prononcé, avec un pI inférieur à 4. La perte de ces exons (le résidu Gln124 est le dernier acide aminé de l'exon 4) confère au fragment Gln124-Tau un comportement électrophorétique en 2D qui tend vers le côté basique (Figure 42) démontrant une baisse de charges négatives.

Une troisième possibilité à ne pas exclure peut être proposée. Il est connu que le domaine amino-terminal de Tau interagit avec de nombreux partenaires. En effet, il a été démontré que l'annexine A2 (Reynolds et al., 2008), la membrane plasmique (Brandt et al., 1995) ou encore la dynactine (Magnani et al., 2007) interagissent avec le domaine de projection de la protéine Tau. Nous pouvons logiquement émettre l'hypothèse que la perte de ce domaine amino-terminal impliqué dans ces interactions pourrait entraîner la libération de ces partenaires, ce qui augmenterait la disponibilité du fragment Gln124-Tau pour interagir avec les microtubules. De plus, cette région amino-terminale présente un domaine PAD pour « *Phosphatase Activated Domain* » qui, lorsqu'il est phosphorylé sur le résidu Tyr18 augmente la disponibilité de la protéine Tau pour les microtubules (Kanaan et al., 2012). Dans ce cas, la perte des acides amino-terminaux de Tau par troncation mimerait ce processus.

II.C Quelles peuvent-être les conséquences fonctionnelles liées à la stabilisation des microtubules ?

L'une des premières conséquences d'une augmentation de la stabilité des microtubules est l'augmentation des niveaux d'acétylation de l' α -tubuline. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que la hausse d'acétylation observée au sein de nos expériences lorsque le fragment Gln124-Tau est surexprimé ne soit pas liée à une modulation des activités enzymatiques impliquées dans l'acétylation et le désacétylation de l' α -tubuline. Il a déjà été montré d'une part, que les protéines Tau et HDAC6, une enzyme impliquée dans la désacétylation de la

tubuline au sein des neurones, interagissent ensembles, et d'autre part, que cette interaction module l'activité d'HDAC6 (Ding et al., 2008; Perez et al., 2009). Nous avons de ce fait déterminé si la surexpression du fragment Gln124-Tau diminuait cette activité HDAC6. De façon inattendue, nos résultats démontrent que l'effet sur l'acétylation de la tubuline est indépendant de toutes modulations d'expression, de localisation ou d'activité HDAC6. Afin de compléter cette étude, il serait donc intéressant ici d'élucider les conséquences de la surexpression des fragments sur l'activité de l' α -TAT1 et de Sirt2 (North et al., 2003; Maxwell et al., 2011; Kalebic et al., 2013; Kim et al., 2013). En addition de ces enzymes, il a été décrit récemment que Tau serait dotée d'une activité auto-acétyltransférase dépendante de ces deux résidus cystéine localisées dans les motifs répétés (Cohen et al., 2013; Luo et al., 2014). Déterminer si Tau serait capable d'acétyler les microtubules *in cellulo* et si la perte des 123 premiers acides aminés de Tau diminue cette activité acétyltransférase sont des perspectives mécanistiques à étudier.

Au delà d'être un marqueur de la stabilité microtubulaires, des travaux ont démontré que l'acétylation de l' α -tubuline régule le trafic des protéines au sein des neurones, notamment en influençant les propriétés de la kinésine, moteur moléculaire responsable du transport axonal antérograde (Reed et al., 2006). En accord avec ces résultats, il a également été montré que l'acétylation de l' α -tubuline permet d'augmenter le transport antérograde des vésicules de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), facteur neurotrophique impliqué dans la croissance et la différenciation neuronal (Dompierre et al., 2007). Comme la kinésine se lie avec une plus forte affinité sur les microtubules acétylés, le fragment Gln124-Tau permettrait en augmentant le niveau d'acétylation de l' α -tubuline une liaison plus forte de la kinésine et aurait un impact sur le transport axonal.

Par ailleurs, l'acétylation de l' α -tubuline servirait également à recruter des protéines capable de sectionner les microtubules (Sudo and Baas, 2010). Le sectionnement des microtubules est une réaction physiologique qui génère des cassures internes au sein des microtubules et, contrairement à la dépolymérisation, est une réaction qui ne peut pas se produire *in vitro* avec de la tubuline purifiée (Roll-Mecak and McNally, 2010). Les protéines impliquées dans ce processus cellulaire sont les spastines et les katanines, dont l'activité est dépendante de l'ATP. Au niveau neuronal, le sectionnement des microtubules jouerait un rôle important pendant la différenciation neuronale (Yu et al., 2008b; Riano et al., 2009). De façon intéressante, il a été montré que le recrutement de la katanine au sein des microtubules se produit lorsque les microtubules sont acétylés (Sudo and Baas, 2010). Comme la surexpression du fragment

Gln124-Tau entraîne une augmentation de l'acétylation de l' α -tubuline, il serait intéressant de déterminer si cette hausse d'acétylation s'accompagne d'un recrutement de la katatine.

A côté de l'acétylation, d'autres modifications post-traductionnelles des microtubules comme la polyglutamylation peuvent entraîner des sectionnements microtubulaires (Lacroix et al., 2010). Cette modification marque préférentiellement des populations axonales de microtubules stabilisés. Dans le contexte de la MA, une étude a démontré au sein d'un modèle de culture primaire de neurones, qu'un traitement des cellules à l'A β entraîne une polyglutamylation des microtubules (Zempel et al., 2013). Ceci s'accompagne d'un recrutement des spastines qui génèrent des cassures au sein des microtubules, et *in fine*, à des déficits du transport des organites le long des microtubules et à une perte synaptique. Ceci suggère donc qu'une dérégulation du réseau microtubulaire par polyglutamylation peut engendrer des effets nefastes sur l'intégrité neuronale.

III. Perspectives

En conclusion, notre étude a permis l'identification de vingt quatre sites de clivage à partir du tissu cérébral humain. L'identification de ces sites de clivage constitue une étape essentielle pour acquérir de nouvelles connaissances sur l'impact de la troncation sur la biologie de Tau et son rôle dans les mécanismes physiopathologiques. Les premières études ont consisté à étudier l'effet de la surexpression de certains fragments de Tau précédemment identifiés vis-à-vis de la dynamique microtubulaire. Nos résultats montrent de manière inattendue qu'un fragment de Tau démunie des 123 premiers acides aminés présente un gain de fonction. En effet, ce fragment est capable de se lier plus fortement aux microtubules en comparaison à la protéine Tau entière. Ce fragment confère également aux microtubules une résistance accrue à la dépolymérisation supportant l'idée que ce fragment stabilise plus fortement les microtubules, ce qui résulte d'une augmentation des niveaux d'acétylation de l' α -tubuline. L'ensemble de nos résultats ouvre plusieurs perspectives.

III.A Validation de la pertinence des sites de clivage identifiés chez l'Homme

La première perspective de ce projet de thèse vise à valider sur un grand nombre d'échantillons et par d'autres approches la présence et l'abondance des fragments de Tau débutant avec ces vingt quatre acides aminés amino-terminaux identifiés à partir de tissus cérébraux humains. Deux approches peuvent être proposées pour cette validation : la SRM,

dont les mises au points ont commencé et les quantifications immunologiques basées sur le développement d'anticorps monoclonaux spécifiques de chacun des sites de clivage.

Pour rappel, la SRM est basée sur l'utilisation de peptides isotopiques standards qui permettent de quantifier de manière ciblée les peptides équivalents présents au sein d'un milieu complexe (Picotti and Aebersold, 2012; Law and Lim, 2013). Cette approche présente néanmoins l'inconvénient de ne quantifier que les peptides qui auront les mêmes caractéristiques physico-chimiques que celles du standard isotopique. Tau étant une protéine naturellement soumise à de nombreuses modifications post-traductionnelles, les analyses de SRM peuvent être biaisées si les peptides équivalents portent une MPT, ce qui est fort probable dans le contexte de la MA caractérisée entre autres par une hyperphosphorylation de Tau. La seconde approche, même si elle est très fastidieuse, s'avère plus judicieuse afin d'obtenir une quantification fiable. Le développement d'anticorps monoclonaux permettrait :

- de déterminer si un site de clivage est spécifique à un contexte pathologique dans le cadre de la MA voire même d'autres Tauopathies puisque les analyses des protéines Tau dans ces maladies neurodégénératives révèlent l'existence de fragments de troncation de Tau (Hanger and Wray, 2010).
- d'établir, si elle existe, une corrélation entre l'abondance d'un site de clivage et une progression de la pathologie Tau.
- de déterminer si un site de clivage peut être retrouvé en condition physiologique.
- de déterminer à l'aide de ces outils immunologiques si certains des sites de clivage identifiés sont retrouvés au sein de LCS dans la MA et les autres Tauopathies. En effet, les protéines Tau retrouvées au sein du liquide cébrospinal sont majoritairement des fragments de troncation (Johnson et al., 1997; Meredith et al., 2013; Amadoro et al., 2014).

Comme générer 24 outils immunologiques est fastidieux, la SRM peut être utilisée dans un premier temps, avec et sans déphosphorylation préalable des échantillons, afin d'évaluer si chaque fragment est retrouvé au sein d'un grand nombre d'individus et d'estimer leur abondance relative.

III.B Identification de nouveaux fragments de Tau au sein d'autres Tauopathies

Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous avons travaillé principalement à partir de tissus cérébraux provenant de patients atteints de la MA. La troncation de la protéine Tau ne se limite pas à cette maladie puisque l'analyse électrophorétique des protéines Tau au sein d'autres

Tauopathies comme la PSP, la DCB ou encore la maladie de Pick révèle l'existence de profils de troncation différents (Arai et al., 2004; Hanger and Wray, 2010). Le développement d'outils immunologiques a permis de valider l'existence d'un fragment de Tau débutant en Thr169 dans la DCB et d'un fragment commençant en Glu187 retrouvé uniquement dans la PSP (Arai et al., 2004). En accord avec ces résultats, ces sites de clivage n'ont pas été retrouvés au sein de notre étude.

Appliquer l'approche protéomique que nous avons développée constitue une perspective intéressante afin d'identifier de nouveaux fragments de troncation de Tau comme outils de diagnostic complémentaires à la neuropathologie.

III.C Approfondir la relation structure-fonction du fragment Gln124-Tau

Concernant l'aspect fonctionnel, nos résultats montrent que la surexpression du fragment débutant au résidu Gln124 s'accompagne d'une augmentation de la stabilité des microtubules associée à une hausse de l'acétylation de l' α -tubuline. Afin de déterminer si la diminution de la phosphorylation sur les sérines 252 et 356 (épitope 12E8) observée au sein du fragment Gln124-Tau est à l'origine d'une affinité de ce fragment plus forte pour les microtubules, il serait intéressant de caractériser les propriétés de ce fragment portant des mutations sur ces sérines vis-à-vis des microtubules. Des études complémentaires *in vitro* sont également nécessaires pour déterminer si ce fragment Gln124-Tau présente réellement une augmentation d'affinité pour les microtubules, notamment par des tests de co-sédimentation du fragment Gln124-Tau et de la tubuline polymérisée, et ce, indépendamment de son état de phosphorylation. Ce type d'approche présente également l'avantage de faciliter l'étude de la polymérisation microtubulaire et est compatible avec des observations en microscopie électronique pour déterminer d'éventuelles différences qualitatives sur les microtubules et pour mieux caractériser les effets de ce fragments vis-à-vis de la dynamique microtubulaire.

III.D Etudier les conséquences cellulaires liées à la surexpression du fragment Gln124-Tau

Les microtubules servent de support aux protéines motrices impliquées dans le transport axonal comme la dynéine et la kinésine. De plus, ils interviennent dans le processus de formation de l'axone et des neurites pendant la différenciation neuronale. En régulant la dynamique microtubulaire, le fragment Gln124-Tau serait donc capable de moduler ces deux

processus cellulaires nécessaires à l'intégrité neuronale. Etudier les conséquences dans des modèles cellulaires adaptés comme la culture primaire de neurones constitue une perspective également très intéressante.

Pour cela, nous pouvons développer des vecteurs d'expression dont l'utilisation est compatible avec des cultures primaires afin d'induire l'expression du fragment Gln124-Tau. L'utilisation de système microfluidiques permettrait d'isoler des compartiments axonnaires. Ainsi, nous pourrions évaluer la distribution des protéines motrices du transport axonal ou celle d'organites intracellulaires comme les mitochondries ou les peroxysomes le long du réseau microtubulaire axonal afin de déterminer si une augmentation de la stabilité microtubulaire induite par le fragment Gln124-Tau perturbe le transport axonal. Ce type d'expériences peut s'envisager à partir de culture primaire de rats sauvages qui expriment naturellement les six isoformes de la protéine Tau afin d'étudier également les propriétés de ce fragment dans un contexte physiologique ou l'ensemble des isoformes de Tau est présent. Ceci permettrait également de déterminer si le fragment Gln124-Tau perturbe la fonction et la localisation cellulaire des protéines Tau intactes. L'utilisation d'un modèle de culture primaire est également intéressante pour étudier les conséquences de la surexpression du fragment Gln124-Tau sur la différenciation neuronale.

Dans l'ensemble de notre étude, nous utilisons un modèle d'expression transitoire de la protéine Tau entière et de ces fragments. Ce type d'approches ne nous permet pas d'étudier si les fragments de troncation sont toxiques pour les cellules. Ainsi, des modèles d'expression stable dans des culture primaires de neurones peuvent s'avérer aussi intéressants pour étudier cette propriété.

Dans le cadre de cette thèse, nos études fonctionnelles se sont cantonnées à la caractérisation de quatre sites de clivage amino-terminaux identifiés à partir du tissu cérébral humain et à l'impact de la surexpression des fragments de troncation de Tau débutant par ces quatre sites sur la régulation de la dynamique microtubulaire. Nos travaux constituent donc une ébauche de l'étude générale de la troncation de Tau sur la biologie et la physiopathologie de cette protéine. Sachant que Tau est une protéine à plusieurs facettes, et dans le but de compléter les connaissances que nous avons sur la troncation de Tau, il conviendrait de déterminer dans quelles mesures les fragments de troncation que nous avons identifiés sont capables de modifier les propriétés fonctionnelles de Tau. Chaque fragment pourrait moduler la localisation cellulaire de Tau et les conséquences cellulaires associées, que ce soit au niveau synaptique, membranaire, nucléaire. Tau étant naturellement sécrétée, il serait également

intéressant de déterminer si les fragments de manière générale sont plus ou moins sécrétés. Ces fragments pourraient également présenter des propriétés d'agent de nucléation entraînant ainsi leur propre agrégation et celle de la protéine Tau entière. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour approfondir nos connaissances sur l'effet de la troncation de la protéine Tau.

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.
- Al-Bassam J, Corbett KD (2012) α -Tubulin acetylation from the inside out. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:19515–19516.
- Alonso ADC, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2004) Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem* 279:34873–34881.
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung 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*.
- Amano T, Richelson E, Nirenberg M (1972) Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc Natl Acad Sci USA* 69:258–263.
- Amos L, Schlieper D (2005). Microtubules and MAPs. *Advances in Protein Chemistry* 257–298
- Anderson JP et al. (2006) Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 281:29739–29752.
- Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739:91–103.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31:10626–10633.
- Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4:398–403.
- Ansari NA, Moinuddin, Ali R (2011) Glycated lysine residues: a marker for non-enzymatic protein glycation in age-related diseases. *Dis Markers* 30:317–324.
- Antoniak S, Mackman N (2014) Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection. *Blood* 123:2605–2613.
- 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 (2011) Towards a functional understanding of protein N-terminal acetylation. *PLoS Biol* 9:e1001074.
- 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, 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.
- Aswad DW, Paranandi MV, Schurter BT (2000) Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis. *J Pharm Biomed Anal* 21:1129–1136.
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow E-M, Hyman BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103:26–35.
- Awadé AC, Cleuziat P, Gonzalès T, Robert-Baudouy J (1994) Pyrrolidone carboxyl peptidase (Pcp): an enzyme that removes pyroglutamic acid (pGlu) from pGlu-peptides and pGlu-proteins. *Proteins* 20:34–51.

B

- Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 152:879–884.
- Bailey RM, Covy JP, Melrose HL, Rousseau L, Watkinson R, Knight J, Miles S, Farrer MJ, Dickson DW, Giasson BI, Lewis J (2013) LRRK2 phosphorylates novel tau epitopes and promotes tauopathy. *Acta Neuropathol* 126:809–827.
- Baptista MJ, O'Farrell C, Daya S, Ahmad R, Miller DW, Hardy J, Farrer MJ, Cookson MR (2003) Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines. *Journal of Neurochemistry* 85:957–968.
- 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.
- 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.

- Baudry M, Chou MM, Bi X (2013) Targeting calpain in synaptic plasticity. *Expert Opin Ther Targets* 17:579–592.
- Becher MW, Kotzuk JA, Sharp AH, Davies SW, Bates GP, Price DL, Ross CA (1998) Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidoluysian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiol Dis* 4:387–397.
- Becker A, Kohlmann S, Alexandru A, Jagla W, Canneva F, Bäuscher C, Cynis H, Sedlmeier R, Graubner S, Schilling S, Demuth H-U, Hörsten von S (2013) Glutaminyl cyclase-mediated toxicity of pyroglutamate-beta amyloid induces striatal neurodegeneration. *BMC Neurosci* 14:108.
- Bergen von M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. 97:5129–5134.
- Bergen von M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J, Mandelkow E-M, Mandelkow E (2001) Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *Journal of Biological Chemistry* 276:48165–48174.
- 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.
- Beyer K, Ariza A (2013) α -Synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 47:509–524.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153–163.
- Biernat J, Mandelkow EM (1999) The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell* 10:727–740.
- Binder LI, 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.
- Blum R, Konnerth A (2005) Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)* 20:70–78.
- 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.
- Borroni B, Malinverno M, Gardoni F, Alberici A, Parnetti L, Premi E, Bonuccelli U, Grassi M, Perani D, Calabresi P, Di Luca M, Padovani A (2008) Tau forms in CSF as a reliable biomarker for progressive supranuclear palsy. *Neurology* 71:1796–1803.

- Borroni B, Gardoni F, parnetti L, Magno L, Malinverno M, Saggese E, Calabresi P, Spillantini MG, Padovani A, Di Luca M (2009) Pattern of Tau forms in CSF is altered in progressive supranuclear palsy. 30:34–40.
- 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 (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging* 16:271–8–discussion278–84.
- 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, 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.
- Breitling J, Aebi M (2013) N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a013359–a013359.
- Bretteville A, Ando K, Ghestem A, Loyens A, Bégard S, Beauvillain J-C, Sergeant N, Hamdane M, Buée L (2009) Two-dimensional electrophoresis of tau mutants reveals specific phosphorylation pattern likely linked to early tau conformational changes. *PLoS ONE* 4:e4843.
- Breuzard G, Hubert P, Nouar R, De Bessa T, Devred F, Barbier P, Sturgis JM, Peyrot V (2013) Molecular mechanisms of Tau binding to microtubules and its role in microtubule dynamics in live cells. *J Cell Sci* 126:2810–2819.
- 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.
- Brower CS, Piatkov KI, Varshavsky A (2013) Neurodegeneration-associated protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway. *Mol Cell* 50:161–171.
- Buée L, Bussi re T, Bu e-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95–130.
- Bu e-Scherrer V, Condamines O, Mourton-Gilles C, Jakes R, Goedert M, Pau B, Delacourte A (1996a) AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 39:79–88.
- Bu e-Scherrer V, Hof PR, Bu e L, Leveugle B, Vermersch P, Perl DP, Olanow CW, Delacourte A (1996b) Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol* 91:351–359.
- Bussi re T, Hof PR, Mailliot C, Brown CD, Caillet-Boudin ML, Perl DP, Bu e L, Delacourte A (1999) Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol* 97:221–230.

- Butler M, Shelanski ML (1986) Microheterogeneity of microtubule-associated tau proteins is due to differences in phosphorylation. *Journal of Neurochemistry* 47:1517–1522.
- Butner KA, Kirschner MW (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *The Journal of Cell Biology* 115:717–730.
- Butterfield DA, Abdul HM, Opii W, Newman SF, Joshi G, Ansari MA, Sultana R (2006) Pin1 in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 98:1697–1706.

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.
- Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461–463.
- Caceres A, Potrebic S, Kosik KS (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* 11:1515–1523.
- Calamini B, Morimoto RI (2012) Protein homeostasis as a therapeutic target for diseases of protein conformation. *Curr Top Med Chem* 12:2623–2640.
- Campbell BC, McLean CA, Culvenor JG, Gai WP, Blumbergs PC, Jäkälä P, Beyreuther K, Masters CL, Li QX (2001) The solubility of alpha-synuclein in multiple system atrophy differs from that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 76:87–96.
- 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.
- Cappelletti G, Tedeschi G, Maggioni MG, Negri A, Nonnis S, Maci R (2004) The nitration of tau protein in neurone-like PC12 cells. *FEBS Letters* 562:35–39.
- Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA (1997) Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci* 17:6142–6151.
- Cataldo AM, Hamilton DJ, Nixon RA (1994) Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. *Brain Res* 640:68–80.
- 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.

- Chambraud B, Sardin E, Giustiniani J, Dounane O, Schumacher M, Goedert M, Baulieu E-E (2010) A role for FKBP52 in Tau protein function. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2658–2663.
- Chandana R, Mythri RB, Mahadevan A, Shankar SK, Srinivas Bharath MM (2009) Biochemical analysis of protein stability in human brain collected at different post-mortem intervals. *Indian J Med Res* 129:189–199.
- 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 NJ, 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) Dansyl-peptides 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 (2003) Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* 278:187–193.
- Cho J-H, Johnson GVW (2004) Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *Journal of Neurochemistry* 88:349–358.
- 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.
- Citron BA, SantaCruz KS, Davies PJ, Festoff BW (2001) Intron-exon swapping of transglutaminase mRNA and neuronal Tau aggregation in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:3295–3301.
- 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 P (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* 4:E127–E130.
- Cohen TJ, Friedmann D, Hwang AW, Marmorstein R, Lee VMY (2013) The microtubule-associated tau protein has intrinsic acetyltransferase activity. *Nat Struct Mol Biol*.
- 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.

- Cohen TJ, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2011b) TDP-43 functions and pathogenic mechanisms implicated in TDP-43 proteinopathies. *Trends Mol Med* 17:659–667.
- Condamines O, Buée-Scherrer V, Boissier L, Wattez 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.
- Congdon EE, Gu J, Sait HBR, Sigurdsson EM (2013) Antibody uptake into neurons occurs primarily via clathrin-dependent Fcγ receptor endocytosis and is a prerequisite for acute tau protein clearance. *Journal of Biological Chemistry* 288:35452–35465.
- 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.
- Creclius A, Götz A, Arzberger T, Fröhlich T, Arnold GJ, Ferrer I, Kretschmar HA (2008) Assessing quantitative post-mortem changes in the gray matter of the human frontal cortex proteome by 2-D DIGE. *Proteomics* 8:1276–1291.
- Crimins JL, Pooler A, Polydoro M, Luebke JI, Spires-Jones TL (2013) The intersection of amyloid β and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* 12:757–763.
- 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.
- Cynis R, Rahfeld JU, Stephan A, Kehlen A, Koch B, Wermann M, Demuth HU, Schilling S (2008) Isolation of an isoenzyme of human glutaminyl cyclase: retention in the Golgi complex suggests involvement in the protein maturation machinery. 379:966–980.

D

- Daher JPL, Ying M, Banerjee R, McDonald RS, Hahn MD, Yang L, Flint Beal M, Thomas B, Dawson VL, Dawson TM, Moore DJ (2009) Conditional transgenic mice expressing C-terminally truncated human alpha-synuclein (alphaSyn119) exhibit reduced striatal dopamine without loss of nigrostriatal pathway dopaminergic neurons. *Mol Neurodegener* 4:34.
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci*

114:1179–1187.

- 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.
- DeKosky ST, Scheff SW (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457–464.
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Wattez A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52:1158–1165.
- Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N, Buée L, Hof PR, Wattez A, Laroche-Cholette A, Mathieu J, Chagnon P, Gauvreau D (1996) Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:159–168.
- Delacourte A, Sergeant N, Champain D, Wattez A, Maurage C-A, Lebert F, Pasquier F, David JP (2002) Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 59:398–407.
- 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.
- Dias-Santagata D, Fulga TA, Duttaroy A, Feany MB (2007) Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *J Clin Invest* 117:236–245.
- Dickson DW (2004) Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest* 114:23–27.
- Dickson DW (2012) Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009258–a009258.
- Dickson DW, Kouri N, Murray ME, Josephs KA (2011) Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau). *J Mol Neurosci* 45:384–389.
- 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.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel JP, Carraway R, Reeves SA (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14:1075–1081.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990–1993.

- Ding H, Dolan PJ, Johnson GW (2008) Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. 106:2119–2130.
- Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF (2008) Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319:1086–1089.
- Dompiere JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelières FP, King SJ, Humbert S, Saudou F (2007) Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *Journal of Neuroscience* 27:3571–3583.
- Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, Gurish MF, Orgill DP, Hamilton MJ, Krilis SA, Stevens RL (2014) Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv Immunol* 122:211–252.
- 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, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297–308.
- 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.
- Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103:2739–2746.
- 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 (2014a) Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. Avila J, ed. *PLoS ONE* 9:e100760.
- 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 (2014b) Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol Commun* 2:14.
- Dumanchin C, Camuzat A, Campion D, Verpillat P, Hannequin D, Dubois B, Saugier-Verber P, Martin C, Penet C, Charbonnier F, Agid Y, Frebourg T, Brice A (1998) Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. *Hum Mol Genet* 7:1825–1829.
- Duyckaerts C, Bannecib 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.

dYdewalle C, Bogaert E, Van Den Bosch L (2012) HDAC6 at the Intersection of Neuroprotection and Neurodegeneration. *Traffic* 13:771–779.

E

Ehrnhoefer DE, Sutton L, Hayden MR (2011) Small changes, big impact: posttranslational modifications and function of huntingtin in Huntington disease. *Neuroscientist* 17:475–492.

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

Endoh R, Ogawara M, Iwatsubo T, Nakano I, Mori H (1993) Lack of the carboxyl terminal sequence of tau in ghost tangles of Alzheimer's disease. *Brain Res* 601:164–172.

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

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

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.

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.

Fauquant C, Redeker V, Landrieu I, Wieruszeski J-M, Verdegem D, Laprévote O, Lippens G, Gigant B, Knossow M (2011) Systematic identification of tubulin-interacting fragments of the microtubule-associated protein Tau leads to a highly efficient promoter of microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry* 286:33358–33368.

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

Ferrer I, Martinez A, Boluda S, Parchi P, Barrachina M (2008) Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank* 9:181–194.

Ferrer I, Santpere G, Arzberger T, Bell J, Blanco R, Boluda S, Budka H, Carmona M, Giaccone G, Krebs B, Limido L, Parchi P, Puig B, Strammiello R, Ströbel T, Kretzschmar H (2007) Brain protein preservation largely depends on the postmortem storage temperature:

- implications for study of proteins in human neurologic diseases and management of brain banks: a BrainNet Europe Study. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:35–46.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M, Alzheimer's Disease International (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112–2117.
- Fischer D, Mukrasch MD, Biernat J, Bibow S, Blackledge M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009) Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry* 48:10047–10055.
- FISCHER EH, KREBS EG (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem* 216:121–132.
- 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.
- Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S (1997) Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. In, pp 706–715. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Fountaine TM, Wade-Martins R (2007) RNA interference-mediated knockdown of alpha-synuclein protects human dopaminergic neuroblastoma cells from MPP(+) toxicity and reduces dopamine transport. *J Neurosci Res* 85:351–363.
- Frost B, Jacks RL, Diamond MI (2009) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *Journal of Biological Chemistry* 284:12845–12852.
- Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB (2007) Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9:139–148.
- Funk K, Thomas S, Schafer K, Cooper G, Liao Z, Clark D, Yang A, Kuret J (2014) Lysine methylation is an endogenous post-translational modification of tau protein in human brain and a modulator of aggregation propensity. *Biochem J*.

G

- Gafni J, Ellerby LM (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience* 22:4842–4849.
- Gafni J, Hermel E, Young JE, Wellington CL, Hayden MR, Ellerby LM (2004) Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem* 279:20211–20220.
- Gamblin TC, Berry RW, Binder LI (2003a) Tau polymerization: role of the amino terminus. *Biochemistry* 42:2252–2257.

- 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 (2003b) Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10032–10037.
- Garavelli JS (2000) The RESID database of protein structure modifications: 2000 update. *Nucleic Acids Res* 28:209–211.
- 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, 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.
- 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.
- 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* 23:7403–7414.
- Georgieff IS, Liem RK, Couchie D, Mavilia C, Nunez J, Shelanski ML (1993) Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci* 105 (Pt 3):729–737.
- 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.
- Giustiniani J, Chambraud B, Sardin E, Dounane O, Guillemeau K, Nakatani H, Paquet D, Kamah A, Landrieu I, Lippens G, Baulieu E-E, Tawk M (2014) Immunophilin FKBP52 induces Tau-P301L filamentous assembly in vitro and modulates its activity in a model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:4584–4589.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885–890.
- 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.
- Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82:373–428.
- 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, 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, 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, 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.
- 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.
- 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.
- Graham DL, Gray AJ, Joyce JA, Yu D, O'Moore J, Carlson GA, Shearman MS, Dellovade TL, Hering H (2013) Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology*.
- Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, Pearson J, Shehadeh J, Bertram L, Murphy Z, Warby SC, Doty CN, Roy S, Wellington CL, Leavitt BR, Raymond LA, Nicholson DW, Hayden MR (2006) Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125:1179–1191.
- 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.
- Grynspan F, Griffin WR, Cataldo A, Katayama S, Nixon RA (1997) Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res* 763:145–158.
- 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, 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 H, Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C, LeBlanc AC (2004) Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 165:523–531.

Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994) Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 33:9511–9522.

H

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

Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4389–4394.

Halverson RA, Lewis J, Frausto S, Hutton M, Muma NA (2005) Tau protein is cross-linked by transglutaminase in P301L tau transgenic mice. *Journal of Neuroscience* 25:1226–1233.

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

Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15:112–119.

Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung K-Y, Saxton MJ, Seereeram A, Reynolds CH, Ward MA, Anderton BH (2007) Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem* 282:23645–23654.

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

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885–889.

Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O (2011) Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 80:825–858.

Hasegawa M, Jakes R, Crowther RA, Lee VM, Ihara Y, Goedert M (1996) Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Letters* 384:25–30.

Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 267:17047–17054.

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* 51:525–530.

Hermel E, Gafni J, Propp SS, Leavitt BR, Wellington CL, Young JE, Hackam AS, Logvinova

- AV, Peel AL, Chen SF, Hook V, Singaraja R, Krajewski S, Goldsmith PC, Ellerby HM, Hayden MR, Bredesen DE, Ellerby LM (2004) Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 11:424–438.
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9:1381–1388.
- Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107:1449–1459.
- 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.
- 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, He RQ, Haque N, Qu MH, del Carmen Alonso A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2003) Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci* 60:413–421.
- Hutton M et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702–705.
- Hwang C-S, Shemorry A, Varshavsky A (2010) N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science* 327:973–977.
- Hyman BT (2014) Tau Propagation, Different Tau Phenotypes, and Prion-like Properties of Tau. *Neuron* 82:1189–1190.

I

- Igaz LM, Kwong LK, Chen-Plotkin A, Winton MJ, Unger TL, Xu Y, Neumann M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2009) Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *J Biol Chem* 284:8516–8524.
- Igaz LM, Kwong LK, Xu Y, Truax AC, Uryu K, Neumann M, Clark CM, Elman LB, Miller BL, Grossman M, McCluskey LF, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2008) Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but

not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 173:182–194.

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.

Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM (1999) Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24:751–762.

Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfling H, Chieng B, Christie M, Napier I, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J (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-Zebrowska M, Barcikowska M, Feinstein S, Zekanowski C (2013) A novel MAPT mutation, G55R, in a frontotemporal dementia patient leads to altered Tau function. Feany MB, ed. *PLoS ONE* 8:e76409.

J

Jadhav S, Zilka N, Novak M (2013) Protein truncation as a common denominator of human neurodegenerative foldopathies. *Mol Neurobiol* 48:516–532.

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.

Jancsik V, Filliol D, Felter S, Rendon A (1989) Binding of microtubule-associated proteins (MAPs) to rat brain mitochondria: a comparative study of the binding of MAP2, its microtubule-binding and projection domains, and tau proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 14:372–381.

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

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.

Jin L-W, Shie F-S, Maezawa I, Vincent I, Bird T (2004) Intracellular accumulation of

amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am J Pathol* 164:975–985.

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.

Jung D, Filliol D, Miehe 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

Kalebic N, Sorrentino S, Perlas E, Bolasco G, Martinez C, Heppenstall PA (2013) α TAT1 is the major α -tubulin acetyltransferase in mice. *Nat Commun* 4:1962.

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.

Kanai Y, Takemura R, Oshima T, Mori H, Ihara Y, Yanagisawa M, Masaki T, Hirokawa N (1989) Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J Cell Biol* 109:1173–1184.

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.

Kenessey A, Nacharaju P, Ko LW, Yen SH (1997) Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Journal of Neurochemistry* 69:2026–2038.

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

Kim G-W, Li L, Gorbani M, You L, Yang X-J (2013) Mice lacking α -tubulin acetyltransferase 1 are viable but display α -tubulin acetylation deficiency and dentate gyrus distortion. *Journal of Biological Chemistry* 288:20334–20350.

Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Isobe T, Hasegawa M, Hisanaga S-I (2013) Isomerase Pin1 stimulates dephosphorylation of tau protein at cyclin-dependent kinase (Cdk5)-dependent Alzheimer phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry* 288:7968–7977.

Kiuchi A, Otsuka N, Namba Y, Nakano I, Tomonaga M (1991) Presenile appearance of abundant Alzheimer's neurofibrillary tangles without senile plaques in the brain in myotonic dystrophy. *Acta Neuropathol* 82:1–5.

Klionsky DJ (2000) Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science* 290:1717–1721.

- Ko LW, Ko EC, Nacharaju P, Liu WK, Chang E, Kenessey A, Yen SH (1999) An immunochemical study on tau glycation in paired helical filaments. *Brain Res* 830:301–313.
- Kouri N, Whitwell JL, Josephs KA, Rademakers R, Dickson DW (2011) Corticobasal degeneration: a pathologically distinct 4R tauopathy. *Nat Rev Neurol* 7:263–272.
- 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.
- 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.
- KREBS EG, FISCHER EH (1956) The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 20:150–157.
- 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.
- 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.
- Kuhla B, Haase C, Flach K, Luth HJ, Arendt T, Munch G (2007) Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J Biol Chem* 282:6984–6991.
- ## L
- Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, Gerlich DW, Janke C (2010) Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* 189:945–954.
- Landles C, Sathasivam K, Weiss A, Woodman B, Moffitt H, Finkbeiner S, Sun B, Gafni J, Ellerby LM, Trotter Y, Richards WG, Osmand A, Paganetti P, Bates GP (2010) Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease. *Journal of Biological Chemistry* 285:8808–8823.
- Lavoie SB, Albert AL, Vincent M (2003) [Unexpected roles of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1]. *Med Sci (Paris)* 19:1251–1258.
- Law KP, Lim YP (2013) Recent advances in mass spectrometry: data independent analysis and hyper reaction monitoring. *Expert Rev Proteomics* 10:551–566.
- Ledesma MD, Bonay P, Avila J (1995) Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *Journal of Neurochemistry* 65:1658–1664.
- 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.

- Ledesma MD, Medina M, Avila J (1996) The in vitro formation of recombinant tau polymers: effect of phosphorylation and glycation. *Mol Chem Neuropathol* 27:249–258.
- Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2:1615–1624.
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21):3167–3177.
- Lee KY, Clark AW, Rosales JL, Chapman K, Fung T, Johnston RN (1999) Elevated neuronal Cdc2-like kinase activity in the Alzheimer disease brain. *Neurosci Res* 34:21–29.
- Leryo K, Menu R, conreur JL, Dayanandan R, Loverstone S, Anderton BH, Brion JP (2000) The function of the microtubule-associated protein tau is variably modulated by graded changes in glycogen synthase kinase-3beta activity. 465:34–38.
- Li W, West N, Colla E, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson TM, Jäkälä P, Hartmann T, Price DL, Lee MK (2005) Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2162–2167.
- Lim J, Balastik M, Lee TH, Nakamura K, Liou Y-C, Sun A, Finn G, Pastorino L, Lee VM-Y, Lu KP (2008) Pin1 has opposite effects on wild-type and P301L tau stability and tauopathy. *J Clin Invest* 118:1877–1889.
- Lindwall G, Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259:5301–5305.
- Liou Y-C, Sun A, Ryo A, Zhou XZ, Yu Z-X, Huang H-K, Uchida T, Bronson R, Bing G, Li X, Hunter T, Lu KP (2003) Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* 424:556–561.
- Litersky JM, Johnson GV, Jakes R, Goedert M, Lee M, Seubert P (1996) Tau protein is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II within its microtubule-binding domains at Ser-262 and Ser-356. *Biochem J* 316 (Pt 2):655–660.
- Liu C-W, Giasson BI, Lewis KA, Lee VM, Demartino GN, Thomas PJ (2005a) A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease. *J Biol Chem* 280:22670–22678.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X (2005b) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22:1942–1950.
- 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, Li B, Tung E-J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X (2007) Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur J Neurosci* 26:3429–3436.

- Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Gu J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X (2009a) Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132:1820–1832.
- Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong C-X (2002) Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience* 115:829–837.
- Liu Y, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong C-X (2008) Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Letters* 582:359–364.
- Liu Y-H, Wei W, Yin J, Liu G-P, Wang Q, Cao F-Y, Wang J-Z (2009b) Proteasome inhibition increases tau accumulation independent of phosphorylation. *Neurobiology of Aging* 30:1949–1961.
- LLorens-Martin M, Jurado J, Hernández F, Avila J (2014) GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci* 7:1–11.
- Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8422–8426.
- Love S, Bridges LR, Case CP (1995) Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Brain* 118 (Pt 1):119–129.
- Loy CT, Schofield PR, Turner AM, Kwok JBJ (2014) Genetics of dementia. *Lancet* 383:828–840.
- Lu J, Li T, He R, Bartlett PF, Götz J (2014) Visualizing the microtubule-associated protein tau in the nucleus. *Sci China Life Sci* 57:422–431.
- Lu KP, Finn G, Lee TH, Nicholson LK (2007) Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* 3:619–629.
- Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP (1999) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399:784–788.
- Luo M-H, Tse S-W, Memmott J, Andreadis A (2004) Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain. *Journal of Neurochemistry* 90:340–351.
- Luo Y, Ma B, Nussinov R, Wei G (2014) Structural Insight into Tau Protein's Paradox of Intrinsically Disordered Behavior, Self-Acetylation Activity, and Aggregation. *J Phys Chem Lett* 5:3026–3031.

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 LA,

- Spillantini MG (2007) Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J* 26:4546–4554.
- Mailliot C, Sergeant N, Bussi re T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A, Bu e L (1998) Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Letters* 433:201–204.
- Mandelkow E, Bergen von M, Biernat J, Mandelkow E-M (2007) Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 17:83–90.
- 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.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Alford M, Terry R (1994) Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 174:67–72.
- Masters CL, Selkoe DJ (2012) Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006262–a006262.
- Matthews-Roberson TA, Quintanilla RA, Ding H, Johnson GVW (2008) Immortalized cortical neurons expressing caspase-cleaved tau are sensitized to endoplasmic reticulum stress induced cell death. *Brain Res* 1234:206–212.
- Maxwell MM, Tomkinson EM, Nobles J, Wizeman JW, Amore AM, Quinti L, Chopra V, Hersch SM, Kazantsev AG (2011) The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Hum Mol Genet* 20:3986–3996.
- Mbikay M, Mayne J, Chrétien M (2013) Proprotein convertases subtilisin/kexin type 9, an enzyme turned escort protein: hepatic and extra hepatic functions. *J Diabetes* 5:391–405.
- 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.
- Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM (1996) Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 91:633–641.
- Mercken M, Vandermeeren M, L bke 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.
- Meredith JE, Sankaranarayanan S, Guss V, Lanzetti AJ, Berisha F, Neely RJ, Slemmon JR, Portelius E, Zetterberg H, Blennow K, Soares H, Ahljanian M, Albright CF (2013) Characterization of novel CSF Tau and ptau biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 8:e76523.
- Michell AW, Tofaris GK, Gossage H, Tyers P, Spillantini MG, Barker RA (2007) The effect of truncated human alpha-synuclein (1-120) on dopaminergic cells in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Cell Transplant* 16:461–474.
- Min S-W, Cho S-H, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y,

- Maslah 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.
- Mondragón-Rodríguez S, Mena R, Binder LI, Smith MA, Perry G, García-Sierra F (2008) Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:62–75.
- Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, Boehm J (2012) Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 287:32040–32053.
- Morfini G, Pigino G, Mizuno N, Kikkawa M, Brady ST (2007) Tau binding to microtubules does not directly affect microtubule-based vesicle motility. *J Neurosci Res* 85:2620–2630.
- 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.
- Morris M, Maeda S, Vossell K, Mucke L (2011) The many faces of tau. *Neuron* 70:410–426.
- Mudher A, Shepherd D, Newman TA, Mildren P, Jukes JP, Squire A, Mears A, Drummond JA, Berg S, MacKay D, Asuni AA, Bhat R, Lovestone S (2004) GSK-3 β inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 9:522–530.
- Mukrasch MD, Bergen von M, Biernat J, Fischer D, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2007) The “jaws” of the tau-microtubule interaction. *J Biol Chem* 282:12230–12239.
- Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009) Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol* 7:e34.
- 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.
- Muñoz-Montaña JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Letters* 411:183–188.
- Murray IVJ, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2003) Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* 42:8530–8540.
- Murthy SN, Wilson JH, Lukas TJ, Kuret J, Lorand L (1998) Cross-linking sites of the human tau protein, probed by reactions with human transglutaminase. *Journal of Neurochemistry* 71:2607–2614.
- Mylonas E, Hascher A, Bernadó P, Blackledge M, Mandelkow E, Svergun DI (2008) Domain conformation of tau protein studied by solution small-angle X-ray scattering. *Biochemistry*

47:10345–10353.

N

- Nacharaju P, Ko L, Yen SH (1997) Characterization of in vitro glycation sites of tau. *Journal of Neurochemistry* 69:1709–1719.
- Nakamura K, Greenwood A, Binder L, Bigio EH, Denial S, Nicholson L, Zhou XZ, Lu KP (2012) Proline isomer-specific antibodies reveal the early pathogenic tau conformation in Alzheimer's disease. *Cell* 149:232–244.
- Narkiewicz J, Giachin G, Legname G (2014) In vitro aggregation assays for the characterization of α -synuclein prion-like properties. *Prion* 8.
- Necula M, Kuret J (2004) Pseudophosphorylation and glycation of tau protein enhance but do not trigger fibrillization in vitro. *J Biol Chem* 279:49694–49703.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130–133.
- 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.
- Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6:1028–1042.
- Noble W, Hanger DP, Miller CCJ, Lovestone S (2013) The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol* 4:83.
- Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* 18:3353–3364.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Molecular Cell* 11:437–444.
- 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.
- Nussbaum JM, Schilling S, Cynis H, Silva A, Swanson E, Wangsanut T, Tayler K, Wiltgen B, Hatami A, Röncke R, Reymann K, Hutter-Paier B, Alexandru A, Jagla W, Graubner S, Glabe CG, Demuth H-U, Bloom GS (2012) Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β . *Nature* 485:651–655.

O

- 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.

P

- 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.
- 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.
- Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1010–1019.
- Perdiz D, Mackeh R, Poüs C, Baillet A (2011) The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cellular signaling* 23:763–771.
- Perez M, Santa-Maria I, de Barreda EG, Zhu X, Cabredo JR, Sanchez-Madrid F, Dawson HN, Vitek MP, Perry G, Smith MA, Avila J (2009) Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *Journal of Neurochemistry* 109:1756–1766.
- Perry G, Mulvihill P, Fried VA, Smith HT, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1989) Immunochemical properties of ubiquitin conjugates in the paired helical filaments of Alzheimer disease. *Journal of Neurochemistry* 52:1523–1528.
- Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5355–5358.
- Petrucelli L et al. (2004) CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet* 13:703–714.
- Picotti P, Aebersold R (2012) Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Meth* 9:555–566.
- Polevoda B, Brown S, Cardillo TS, Rigby S, Sherman F (2008) Yeast N(alpha)-terminal acetyltransferases are associated with ribosomes. *J Cell Biochem* 103:492–508.
- Pooler AM, Hanger DP (2010) Functional implications of the association of tau with the plasma membrane. *Biochem Soc Trans* 38:1012–1015.
- 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.

- Pooler AM, Usardi A, Evans CJ, Philpott KL, Noble W, Hanger DP (2012) Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiology of Aging* 33:431.e27–.e38.
- Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 43:815–825.
- Poorkaj P, Muma NA, Zhukareva V, Cochran EJ, Shannon KM, Hurtig H, Koller WC, Bird TD, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Schellenberg GD (2002) An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. *Ann Neurol* 52:511–516.
- 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.

Q

- Qu M-H, Li H, Tian R, Nie C-L, Liu Y, Han B-S, He R-Q (2004) Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport* 15:2723–2727.

R

- Radi R (2013) Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res* 46:550–559.
- 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 MV, McBrayer MK, Campbell J, Kumar A, Hashim A, Serksen 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.
- Ravache M, Abou-Sleymane G, Trottier Y (2010) [Neurodegenerative polyglutamine expansion diseases: physiopathology and therapeutic strategies]. *Pathol Biol* 58:357–366.
- Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A (2013) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 42:D503–D509.
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ (2006) Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16:2166–2172.
- Reinecke JB, Devos SL, Mcgrath JP, Shepard AM, Goncharoff DK, Tait DN, Fleming SR, Vincent MP, Steinhilb ML (2011) Implicating calpain in tau-mediated toxicity in vivo. *PLoS ONE* 6:e23865.
- Reyes JF, Fu Y, Vana L, Kanaan NM, Binder LI (2011) Tyrosine nitration within the proline-

- rich region of Tau in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 178:2275–2285.
- Reyes JF, Geula C, Vana L, Binder LI (2012) Selective tau tyrosine nitration in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol* 123:119–132.
- Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, Anderton BH (2000) Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *Journal of Neurochemistry* 74:1587–1595.
- Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, Zvelebil M, Yang A, Sheppard PW, Varndell IM, Hanger DP, Anderton BH (2008) Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem* 283:18177–18186.
- Reynolds MR, Berry RW, Binder LI (2005a) Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 44:1690–1700.
- Reynolds MR, Berry RW, Binder LI (2005b) Site-specific nitration differentially influences tau assembly in vitro. *Biochemistry* 44:13997–14009.
- 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.
- Riano E, Martignoni M, Mancuso G, Cartelli D, Crippa F, Toldo I, Siciliano G, Di Bella D, Taroni F, Bassi MT, Cappelletti G, Rugarli EI (2009) Pleiotropic effects of spastin on neurite growth depending on expression levels. *Journal of Neurochemistry* 108:1277–1288.
- Ringman JM, Coppola G (2013) New genes and new insights from old genes: update on Alzheimer disease. *Continuum (Minneapolis)* 19:358–371.
- 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.
- Roberson ED, Searce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu G-Q, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750–754.
- Rodríguez-Navarro JA, Rodríguez L, Casarejos MJ, Solano RM, Gómez A, Perucho J, Cuervo AM, García de Yébenes J, Mena MA (2010) Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol Dis* 39:423–438.
- Roher AE, Palmer KC, Chau V, Ball MJ (1988) Isolation and chemical characterization of Alzheimer's disease paired helical filament cytoskeletons: differentiation from amyloid plaque core protein. *J Cell Biol* 107:2703–2716.

- 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.
- Roll-Mecak A, McNally FJ (2010) Microtubule-severing enzymes. *Curr Opin Cell Biol* 22:96–103.
- Rubinsztein DC (2006) The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443:780–786.

S

- 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.
- Santa-Maria I, Hernández F, Martín CP, Avila J, Moreno FJ (2004) Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers. *Biochemistry* 43:2888–2897.
- Santpere G, Puig B, Ferrer I (2006) Low molecular weight species of tau in Alzheimer's disease are dependent on tau phosphorylation sites but not on delayed post-mortem delay in tissue processing. *Neurosci Lett* 399:106–110.
- Sarkar M, Kuret J, Lee G (2008) Two motifs within the tau microtubule-binding domain mediate its association with the hsc70 molecular chaperone. *J Neurosci Res* 86:2763–2773.
- Sato Y, Naito Y, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Endo T (2001) Analysis of N-glycans of pathological tau: possible occurrence of aberrant processing of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Letters* 496:152–160.
- Schaeffer V, Lavenir I, Ozcelik S, Tolnay M, Winkler DT, Goedert M (2012) Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain* 135:2169–2177.
- Schilling S, Hoffmann T, Roscher F, Manhart S, Wasternack C, Demuth HU (2002) Heterologous expression and characterization of human glutaminyl cyclase: evidence for a disulfide bond with importance for catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 291:10849–10857.
- Schilling S, Wasternack C, Demuth H-U (2008) Glutaminyl cyclases from animals and plants: a case of functionally convergent protein evolution. *Biol Chem* 389:983–991.
- Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion J-P, Hamdane M, Buée L (2006) Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* 169:599–616.
- Schneider A, Biernat J, Bergen von M, Mandelkow E, Mandelkow EM (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 38:3549–3558.
- Schulze E, Asai DJ, Bulinski JC, Kirschner M (1987) Posttranslational modification and

- microtubule stability. 105:2167–2177.
- 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* 269:24290–24297.
- Seifert F, Schulz K, Koch B, Manhart S, Demuth H-U, Schilling S (2009) Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates. *Biochemistry* 48:11831–11833.
- Seitz A, Kojima H, Oiwa K, Mandelkow E-M, Song Y-H, Mandelkow E (2002) Single-molecule 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, 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.
- 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.
- Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA (2000) Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4897–4902.
- 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.
- Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M, Hisanaga S-I (2012) Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 32:2430–2441.
- Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 9:459–470.
- Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS (2004) CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 279:4869–4876.

- Sillen A, Barbier P, Landrieu I, Iefebvre S, Wieruszeski J-M, Leroy A, Peyrot V, Lippens G (2007) NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules. *Biochemistry* 46:3055–3064.
- Singer SM, Zainelli GM, Norlund MA, Lee JM, Muma NA (2002) Transglutaminase bonds in neurofibrillary tangles and paired helical filament tau early in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 40:17–30.
- Sjöberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 119:2025–2034.
- Smet C, Sambo A-V, Wieruszeski J-M, Leroy A, Landrieu I, Buée L, Lippens G (2004) The peptidyl prolyl cis/trans-isomerase Pin1 recognizes the phospho-Thr212-Pro213 site on Tau. *Biochemistry* 43:2032–2040.
- 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.
- Sonderegger P, Matsumoto-Miyai K (2014) Activity-controlled proteolytic cleavage at the synapse. *Trends Neurosci* 0.
- Soto C (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. 4:49–60.
- Spillantini MG, Goedert M (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology* 12:609–622.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7737–7741.
- 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-3 β phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem* 275:41340–41349.
- 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.
- Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Fulga TA, Felch DL, Feany MB (2007a) Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Mol Biol Cell* 18:5060–5068.
- Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Mulkearns EE, Shulman JM, Biernat J, Mandelkow E-M, Feany MB (2007b) S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J Neurosci Res* 85:1271–1278.
- Sudo H, Baas PW (2010) Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by

katanin in neurons and fibroblasts. *Journal of Neuroscience* 30:7215–7226.

Sultan A, Nesslany F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas M-C (2011) Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *Journal of Biological Chemistry* 286:4566–4575.

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):953–964.

Tan C-F, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O, Iwasaki T, Tsujino A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2007) TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol* 113:535–542.

Tarhan MC, Orazov Y, Yokokawa R, Karsten SL, Fujita H (2013) Biosensing MAPs as “roadblocks”: kinesin-based functional analysis of tau protein isoforms and mutants using suspended microtubules (sMTs). *Lab Chip* 13:3217–3224.

Tatebayashi Y, Haque N, Tung Y-C, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2004) Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. *J Cell Sci* 117:1653–1663.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572–580.

Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58:1791–1800.

Thomas S, Funk K, Wan Y, Liao Z, Davies P, Kuret J, Yang A (2012) Dual modification of Alzheimer's disease PHF-tau protein by lysine methylation and ubiquitylation: a mass spectrometry approach. *Acta Neuropathol* 123:105–117.

Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456–1462.

Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19:94–102.

Torres CR, Hart GW (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 259:3308–3317.

Troy CM, Rabacchi SA, Friedman WJ, Frappier TF, Brown K, Shelanski ML (2000) Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. *J Neurosci* 20:1386–1392.

Tseng H-C, Zhou Y, Shen Y, Tsai L-H (2002) A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Letters* 523:58–62.

Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Publishing Group* 11:777–788.

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.

Ulusoy A, Febbraro F, Jensen PH, Kirik D, Romero-Ramos M (2010) Co-expression of C-terminal truncated alpha-synuclein enhances full-length alpha-synuclein-induced pathology. *Eur J Neurosci* 32:409–422.

V

Van der Jeugd A, Vermaercke B, Derisbourg M, Lo AC, Hamdane M, Blum D, Buée L, D'Hooge R (2013) Progressive age-related cognitive decline in tau mice. *J Alzheimers Dis* 37:777–788.

Vanier MT (2010) Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 5:16.

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

Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson DW (1997) Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 17:3588–3598.

Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A, Chauderlier A, Caillierez R, Talahari S, Nessler F, Lefebvre B, Bonnefoy E, Buée L, Galas M-C (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

Wagshal D et al. (2014) Divergent CSF τ alterations in two common tauopathies: Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatr:jnnp-2014-308004*.

Wang D-S, Dickson DW, Malter JS (2008) Tissue transglutaminase, protein cross-linking and Alzheimer's disease: review and views. *Int J Clin Exp Pathol* 1:5–18.

Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med* 2:871–875.

Wang Y, Garg S, Mandelkow E-M, Mandelkow E (2010a) Proteolytic processing of tau. *Biochem Soc Trans* 38:955–961.

Warby SC, Doty CN, Graham RK, Carroll JB, Yang Y-Z, Singaraja RR, Overall CM, Hayden MR (2008) Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically

- colocalize in the nucleus. *Hum Mol Genet* 17:2390–2404.
- Watanabe A, Hong W-K, Dohmae N, Takio K, Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2004) Molecular aging of tau: disulfide-independent aggregation and non-enzymatic degradation in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry* 90:1302–1311.
- Watanabe A, Takio K, Ihara Y (1999) Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments. Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau. *J Biol Chem* 274:7368–7378.
- Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG (1987) Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9040–9044.
- Wei ML, Andreadis A (1998) Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *Journal of Neurochemistry* 70:1346–1356.
- Wei Y, Qu M-H, Wang X-S, Chen L, Wang D-L, Liu Y, Hua Q, He R-Q (2008) Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. Yuan A, ed. *PLoS ONE* 3:e2600.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:1858–1862.
- Wellington CL, Ellerby LM, Gutekunst C-A, Rogers D, Warby S, Graham RK, Loubser O, van Raamsdonk J, Singaraja R, Yang Y-Z, Gafni J, Bredesen D, Hersch SM, Leavitt BR, Roy S, Nicholson DW, Hayden MR (2002) Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience* 22:7862–7872.
- Wellington CL, Hayden MR (2000) Caspases and neurodegeneration: on the cutting edge of new therapeutic approaches. *Clin Genet* 57:1–10.
- Wellington CL, Singaraja R, Ellerby L, Savill J, Roy S, Leavitt B, Cattaneo E, Hackam A, Sharp A, Thornberry N, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR (2000) Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J Biol Chem* 275:19831–19838.
- Wilhelmsen KC, Lynch T, Pavlou E, Higgins M, Nygaard TG (1994) Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *Am J Hum Genet* 55:1159–1165.
- Wilhelmus MMM, Grunberg SCS, Bol JGJM, van Dam A-M, Hoozemans JJM, Rozemuller AJM, Drukarch B (2009) Transglutaminases and transglutaminase-catalyzed cross-links colocalize with the pathological lesions in Alzheimer's disease brain. *Brain Pathol* 19:612–622.
- Wintjens R, Wieruszeski JM, Drobecq H, Rousselot-Pailley P, Buée L, Lippens G, Landrieu I (2001) ¹H NMR study on the binding of Pin1 Trp-Trp domain with phosphothreonine peptides. *J Biol Chem* 276:25150–25156.
- Wischik CM, Novak M (1988) 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 (1988) 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 (2010) Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci* 123:3447–3455.
- Wulf G, Finn G, Suizu F, Lu KP (2005) Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme? *Nat Cell Biol* 7:435–441.

X

- Xie H, Litersky JM, Hartigan JA, Jope RS, Johnson GV (1998) The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain Res* 798:173–183.
- Xu J, Sato S, Okuyama S, Swan RJ, Jacobsen MT, Strunk E, Ikezu T (2010) Tau-tubulin kinase 1 enhances prefibrillar tau aggregation and motor neuron degeneration in P301L FTDP-17 tau-mutant mice. *FASEB J* 24:2904–2915.

Y

- Yavich L, Tanila H, Vepsäläinen S, Jäkälä P (2004) Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *Journal of Neuroscience* 24:11165–11170.
- Yin H, Kuret J (2006) C-terminal truncation modulates both nucleation and extension phases of tau fibrillization. *FEBS Letters* 580:211–215.
- Yu C-H, Si T, Wu W-H, Hu J, Du J-T (2008a) O-GlcNAcylation modulates the self-aggregation ability of the fourth microtubule-binding repeat of tau. *Biochem Biophys Res Commun* 375:59–62.
- Yu W, Qiang L, Solowska JM, Karabay A, Korulu S, Baas PW (2008b) The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol Biol Cell* 19:1485–1498.
- 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

- Zappaterra MW, Lehtinen MK (2012) The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell Mol Life Sci* 69:2863–2878.
- Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow E-M (2010) Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *Journal of Neuroscience* 30:11938–11950.
- 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 JY, Liu SJ, Li HL, Wang JZ (2005b) Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/Mg(2+)-dependent proteasome protease system. *J Neural Transm* 112:547–555.
- Zhang L, Zhang C, Zhu Y, Cai Q, Chan P, Ueda K, Yu S, Yang H (2008) Semi-quantitative analysis of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain Res* 1244:40–52.
- Zhang YJ, Xu YF, Chen XQ, Wang XC, Wang J-Z (2005c) Nitration and oligomerization of tau induced by peroxynitrite inhibit its microtubule-binding activity. *FEBS Letters* 579:2421–2427.
- Zhang YJ, Xu YF, Cook C, Gendron TF, Roettges P, Link CD, Lin W-L, Tong J, Castanedes-Casey M, Ash P, Gass J, Rangachari V, Buratti E, Baralle F, Golde TE, Dickson DW, Petrucelli L (2009) Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7607–7612.
- Zhang YJ, Xu YF, Liu Y-H, Yin J, Li H-L, Wang Q, Wang J-Z (2006) Peroxynitrite induces Alzheimer-like tau modifications and accumulation in rat brain and its underlying mechanisms. *FASEB J* 20:1431–1442.
- 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*.
- Zheng Z, Diamond MI (2012) Huntington disease and the huntingtin protein. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107:189–214.
- Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, Stoller G, Küllertz G, Stark M, Fischer G, Lu KP (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular Cell* 6:873–883.
- Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontsekova E, 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.
- Zilka N, Stozicka Z, Kovac A, Pilipcinec E, Bugos O, Novak M (2009) Human misfolded truncated tau protein promotes activation of microglia and leukocyte infiltration in the

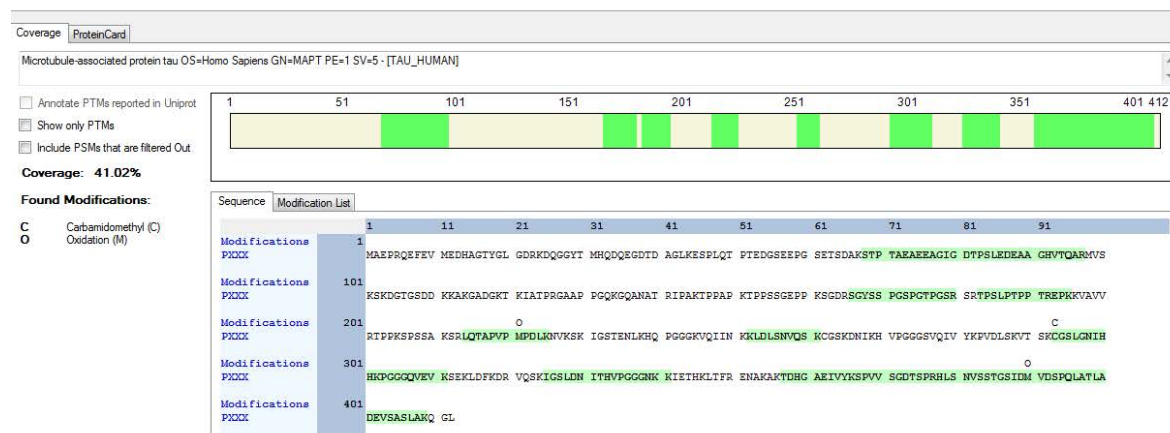
transgenic rat model of tauopathy. *J Neuroimmunol* 209:16–25.

Zilkova M, Zilka N, Kovac A, Kovacech B, Skrabana R, Skrabanova M, Novak M (2011)
Hyperphosphorylated truncated protein tau induces caspase-3 independent apoptosis-like
pathway in the Alzheimer's disease cellular model. *J Alzheimers Dis* 23:161–169.

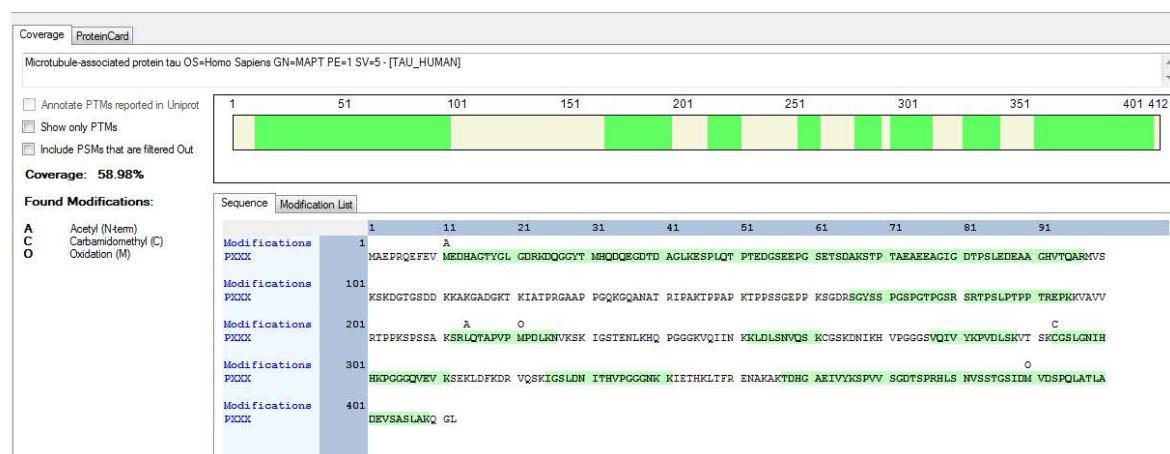
Annexes

I. Recouvrement de séquence de Tau après IP-Tau5 et coloration à l'argent

I.A Bande 26kDa



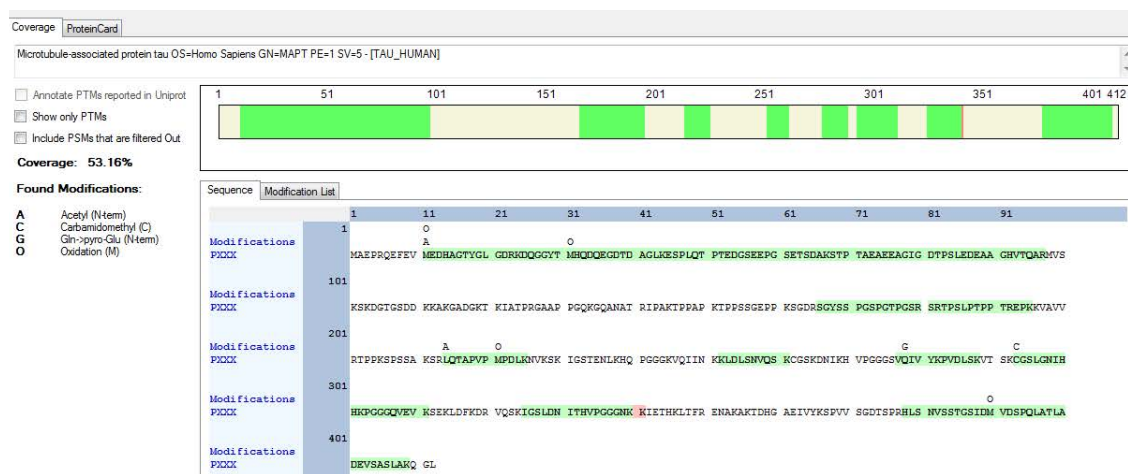
I.B Bande 28kDa



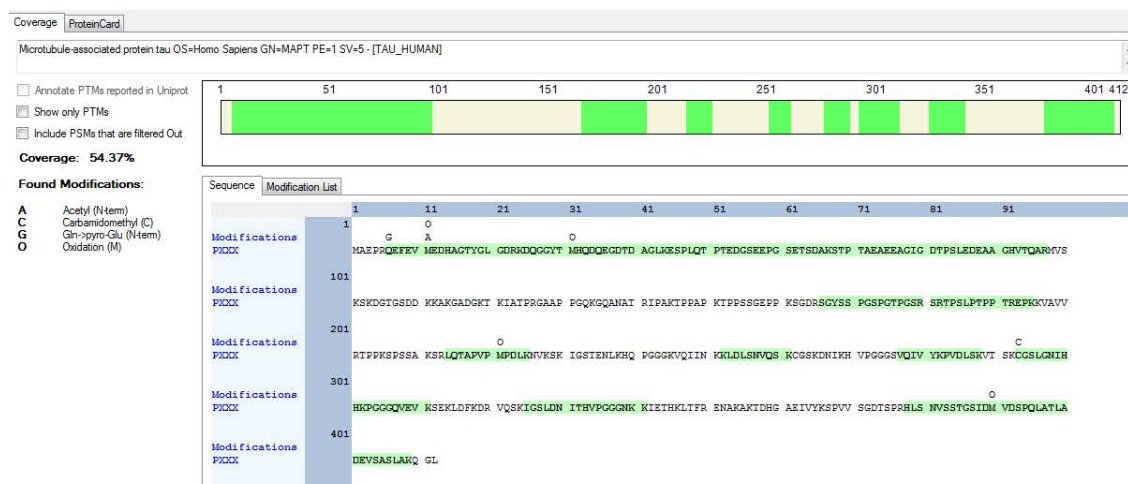
I.C Bande 40kDa



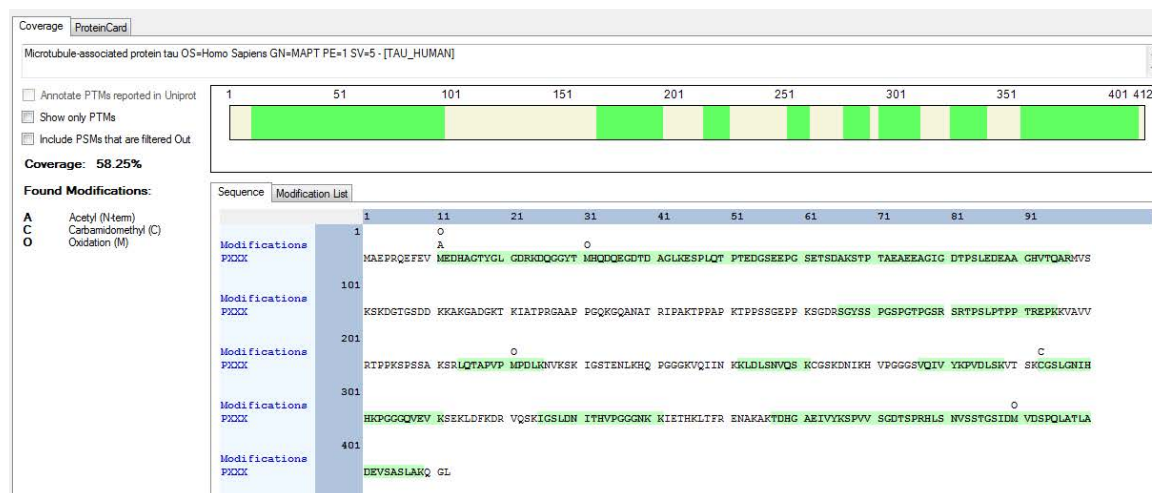
I.D Bande 42kDa



I.E Bande 47kDa



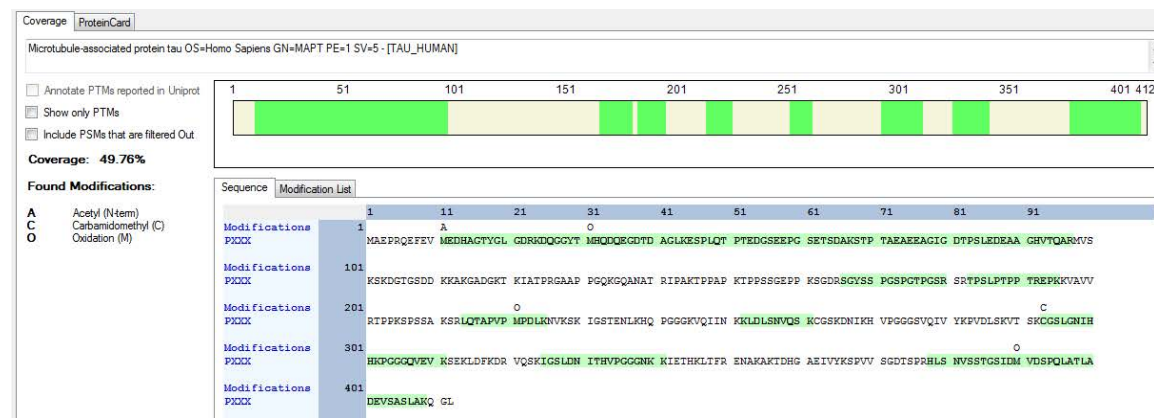
I.F Bande 54kDa



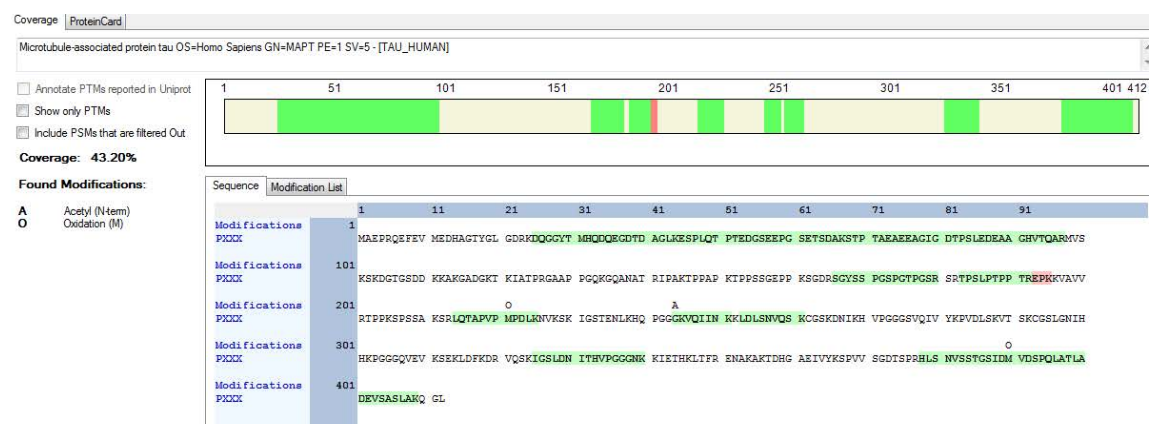
I.G Bande 60kDa



I.H Bande 90kDa



I.I Bande 100kDa



II. Listes des peptides obtenus à partir de tissus cérébraux humains

II.A Peptides non spécifiques

Position du résidu	Clivage N-Ter	Peptides détectés	Modification (s)	MH+ Da
2	non spécifique	AEPRQEFVME	N-Term(Acetyl)	1406,624994
2	non spécifique	AEPRQEFVME	N-Term(Acetyl); M10(Oxidation)	1422,620259
11	non spécifique	MEDHAGTYGLGDR	N-Term(Thio-)	1509,609533
11	non spécifique	MEDHAGTYGLGDR	N-Term(Thio-); M1(Oxidation)	1525,602382
12	non spécifique	EDHAGTYGLGDR	N-Term(Thio-)	1378,569383
103	non spécifique	AEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQAR		2424,124872
124	non spécifique	QARMVSKSK	K7(Thio-); K9(Thio-)	1210,574889
124	non spécifique	QARMVSKSK	K7(Thio-)	1122,573358
124	non spécifique	QARMVSKSK	N-Term(Gln->pyro-Glu); K7(Thio-)	1105,54891
124	non spécifique	QARMVSKSK	m(Gln->pyro-Glu); K7(Thio-); K9(Thio-)	1193,546506
124	non spécifique	QARMVSKSK	M14(Oxidation); K7(Thio-); K9(Thio-)	1226,568794
124	non spécifique	QARMVSKSKDGTGS	K7(Thio-); K9(Thio-)	1627,724352
127	non spécifique	MVSKSKDGTGS	K4(Thio-); K6(Thio-)	1272,526481
147	non spécifique	GKTKIATPR	K2(Thio-); K4(Thio-)	1147,59564
157	non spécifique	AAPPGQKQANATR	K7(Thio-)	1454,71737
159	non spécifique	PPGQKQANATR	K5(Thio-)	1312,64092
172	non spécifique	PAKTPAPK	K3(Thio-)	994,5388646
174	non spécifique	KTPAPKTPSSGEPK	N-Term(Thio-); K7(Thio-)	1891,92823
174	non spécifique	KTPAPKTPSSGEPKSG	K1(Thio-)	1947,986257
224	non spécifique	KKVAVVR	N-Term(Thio-); K2(Thio-)	975,5477082
229	non spécifique	VRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMP	K6(Thio-); K12(Thio-); M22(Oxidation)	2624,339668
232	non spécifique	PPKSPSSAKSR	K3(Thio-); K9(Thio-)	1317,627025
238	non spécifique	SAKSRLQTAPVMP	N-Term(Thio-)	1570,807233
238	non spécifique	SAKSRLQTAPVMP	K3(Thio-); M13(Oxidation)	1586,800622
240	non spécifique	KSRLQTAPVMP	N-Term(Thio-)	1412,737395
240	non spécifique	KSRLQTAPVMP	N-Term(Thio-); M11(Oxidation)	1428,736234
253	non spécifique	PKKVAVVR	K2(Thio-); K3(Thio-)	1072,600142
259	non spécifique	KIGSTENLK	K1(Thio-)	1077,559925
261	non spécifique	GSTENLKHQPGGK	K7(Thio-)	1497,712433
280	non spécifique	KKLDLSNVQSK	N-Term(Thio-); K2(Thio-)	1435,728367
306	non spécifique	VQIVYKPVDSLK	K6(Thio-)	1476,812047
306	non spécifique	VQIVYKPV		945,577304
308	non spécifique	IVYKPVDSLK	N-Term(Thio-); K4(Thio-)	1337,692317
308	non spécifique	IVYKPVDSLK	K4(Thio-)	1249,687268
309	non spécifique	VYKPVDSLK	K3(Thio-)	1136,603479
311	non spécifique	KPVDLSK	N-Term(Thio-); K7(Thio-)	962,469585
311	non spécifique	KPVDLSKVTSK	K1(Thio-); K7(Thio-)	1377,711229
311	non spécifique	KPVDLSKVTSK	K7(Thio-)	1289,713402
314	AspN + non spécifique	DLSKVTSK	K4(Thio-)	965,4976193
331	non spécifique	KPGGGQVEVK	N-Term(Thio-)	1086,56173
369	non spécifique	KKIETHK	K1(Thio-); K2(Thio-)	1059,53111
391	non spécifique	EIVYKSPVVSG	K5(Thio-)	1265,645385
391	non spécifique	EIVYKSPVVSG		1177,643495
395	non spécifique	KSPVVSGDTSPR	N-Term(Thio-)	1317,645529

II.B Peptides Asp-N

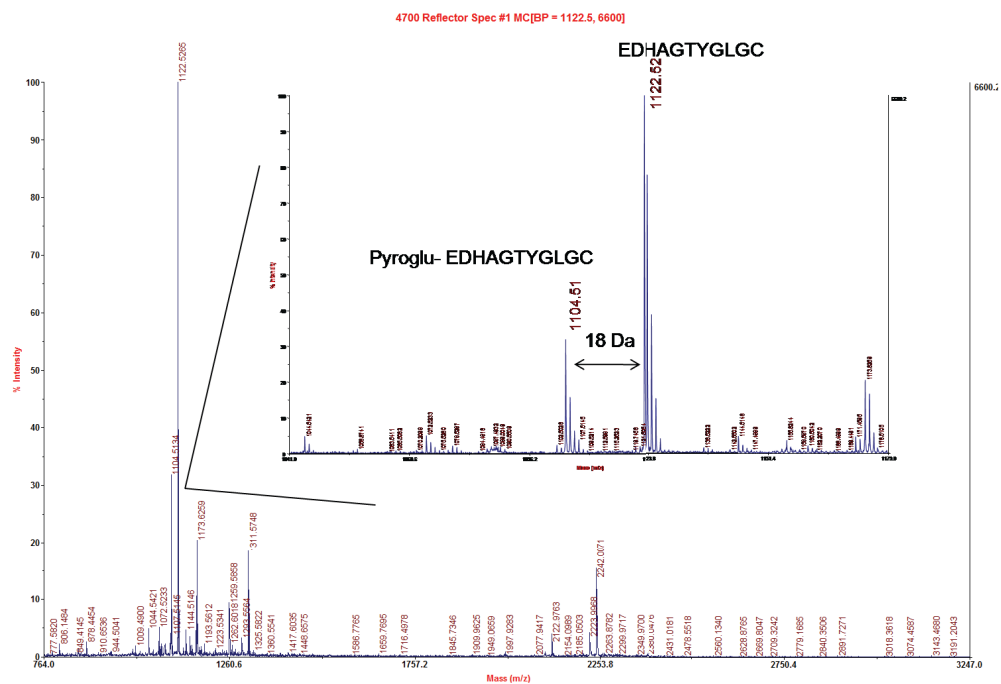
Position du résidu	Clivage N-Ter	Peptides détectés	Modification (s)	MH+ Da
13	Asp-N	DHAGTYGLGDR	N-Term(Thio-)	1249,525141
13	Asp-N	DHAGTYGLGDRK	K12(Thio-)	1377,619417
22	Asp-N	DRKDQGGYTMHQ	N-Term(Thio-)	1523,637398
25	Asp-N	DQGGYTMHQDQEGDTDAGLK		2165,900822
34	Asp-N	DQEGDTDAGLKESPLQTPTE	K11(Thio-)	2218,963182
38	Asp-N	DTDAGLKESPLQTPTE	K7(Thio-)	1789,81828
139	Asp-N	DKKAKGA	K2(Thio-); K3(Thio-); K5(Thio-)	981,4202659
193	Asp-N	DRSGYSSPGSPGTPGSR		1664,763772
252	Asp-N	DLKNVKS	K6(Thio-); K8(Thio-)	1107,553865
252	Asp-N	DLKNVKS	K6(Thio-)	1132,639725
252	Asp-N	DLKNVKSIGSTE	N-Term(Thio-); K6(Thio-); K8(Thio-)	1682,778755
252	Asp-N	DLKNVKSIGSTE	K3(Thio-); K8(Thio-)	1594,778235
252	Asp-N	DLKNVKSIGSTE	K6(Thio-)	1506,784403
283	Asp-N	DLSNVQSK	K8(Thio-)	978,4564042
283	Asp-N	DLSNVQSKC	K8(Thio-); C9(Carbamidomethyl)	1138,485663
283	Asp-N	DLSNVQSKC		993,4650831
283	Asp-N	DLSNVQSKCG	K8(Thio-)	1138,485663
283	Asp-N	DLSNVQSKCGSK	K12(Thio-)	1353,613779
283	Asp-N	DLSNVQSKCGSK	K8(Thio-); K12(Thio-)	1441,610874
283	Asp-N	DLSNVQSKCGSK		1265,615379
295	Asp-N	DNIKHVPGGGSV	N-Term(Thio-)	1267,61057
295	Asp-N	DNIKHVPGGGSVQ	K4(Thio-)	1395,666323
295	Asp-N	DNIKHVPGGGSVQI	K4(Thio-)	1508,753075
295	Asp-N	DNIKHVPGGGSVQIV	K4(Thio-)	1607,819105
295	Asp-N	DNIKHVPGGGSVQIVYKPV	N-Term(Thio-); K17(Thio-)	2183,094178
295	Asp-N	DNITHVPGGGNK	K12(Thio-)	1296,602498
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKK	K12(Thio-); K13(Thio-)	1512,692223
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKK	K12(Thio-)	1424,694639
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKKI	K12(Thio-); K13(Thio-)	1625,775835
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKKIE	K12(Thio-)	1666,819924
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKKIET	K12(Thio-); K13(Thio-)	1855,865546
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKKIETH	K12(Thio-); K13(Thio-)	1992,923665
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKKIETH	K12(Thio-)	1904,923509
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKKIETHK	K12(Thio-); K13(Thio-); K18(Thio-)	2209,018596
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKKIETHK	K12(Thio-); K13(Thio-)	2121,021581
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKKIETHKL	K12(Thio-); K13(Thio-); K18(Thio-)	2322,09952
295	Asp-N	DNITHVPGGGNKKIETHKLTFR	K12(Thio-); K13(Thio-); K18(Thio-)	2726,31926
314	Asp-N	DLSKVTSK	K4(Thio-); K8(Thio-)	1053,494352
314	Asp-N	DLSKVTSK	N-Term(Thio-); K8(Thio-)	1156,505492
314	Asp-N	DLSKVTSKC	Thio-); K8(Thio-); C9(Carbamidomethyl)	1213,52594
314	Asp-N	DLSKVTSKC	K8(Thio-); C9(Carbamidomethyl)	1125,527726
314	Asp-N	DLSKVTSKCG	K4(Thio-); K8(Thio-)	1213,526505
314	Asp-N	DLSKVTSKCG	K4(Thio-)	1125,527701
314	Asp-N	DLSKVTSKCGSL	Thio-); K8(Thio-); C9(Carbamidomethyl)	1470,663766
314	Asp-N	DLSKVTSKCGSL	C9(Carbamidomethyl)	1294,667239
314	Asp-N	DLSKVTSKCGSL		1237,645356
314	Asp-N	DLSKVTSKCGSLG	N-Term(Thio-); K8(Thio-)	1470,662693
314	Asp-N	DLSKVTSKCGSLG	K8(Thio-)	1382,664756
314	Asp-N	DLSKVTSKCGSLG		1294,667409
348	Asp-N	DRVQSKIG	K6(Thio-)	990,5036356
348	Asp-N	DRVQSKIGS	K6(Thio-)	1077,535187
348	Asp-N	DRVQSKIGSL	K6(Thio-)	1190,619334
348	Asp-N	DRVQSKIGSL		1102,622394
348	Asp-N	DRVQSKIGSLD	K6(Thio-)	1305,646102
387	Asp-N	DHGAEIVYKSPVVSG	K9(Thio-)	1645,787444
387	Asp-N	DHGAEIVYKSPVVSG		1557,788648
402	Asp-N	DTSPRHLSNVSTGSI	N-Term(Thio-)	1745,811771
402	Asp-N	DTSPRHLSNVSTGSI		1657,814274
402	Asp-N	DTSPRHLSNVSTGSIDMV		2002,946623

II.C Peptides tryptiques

Position du résidu	Clivage N-Ter	Peptides détectés	Modification (s)	MH+ Da
6	trypsin	QEFEVMEDHAGTYGLGDR	Term(Gln->pyro-Glu); M6(Oxidation)	2052,859366
6	trypsin	QEFEVMEDHAGTYGLGDR		2053,892741
6	trypsin	QEFEVMEDHAGTYGLGDR	M6(Oxidation)	2069,885227
24	trypsin	KDQGGYTMH	K1(Thio-)	1124,449312
24	trypsin	KDQGGYTMHQDEGDTAGLK	K1(Thio-)	2381,998136
24	trypsin	KDQGGYTMHQDEGDTAGLK	K1(Thio-); M8(Oxidation)	2397,99096
68	trypsin	STPTAEDVTAPLVDEGAPGK		1954,963813
127	trypsin	MVSKSKDGTGSDDK	K4(Thio-); K6(Thio-)	1630,671749
127	trypsin	MVSKSKDGTGSDDK	M11(Oxidation); K4(Thio-); K6(Thio-)	1646,665669
131	trypsin	SKDGTGSDDKK	N-Term(Thio-); K11(Thio-)	1313,534572
142	trypsin	AKGADGKTK	N-Term(Thio-); K7(Thio-)	1051,491659
144	trypsin	GADGKTKIATPR	K5(Thio-); K7(Thio-)	1390,677385
144	trypsin	GADGKTKIATPR	N-Term(Thio-); K5(Thio-); K7(Thio-)	1478,679302
156	trypsin	GAAPPGQKQG	K8(Thio-)	998,472517
156	trypsin	GAAPPGQKQGAN	K8(Thio-)	1183,552769
156	trypsin	GAAPPGQKQGANATR	K8(Thio-)	1511,735665
171	trypsin	IPAKTPPAPK	K4(Thio-)	1107,622971
171	trypsin	IPAKTPPAPKTPSSGEPPK	K4(Thio-); K10(Thio-)	2173,10375
175	trypsin	TPPAKTPPSSGEPPK	K6(Thio-)	1675,83398
175	trypsin	TPPAKTPPSSGEPPKSGDR	K6(Thio-); K16(Thio-)	2179,014925
175	trypsin	TPPKSPSSAK	K4(Thio-)	1087,544945
175	trypsin	TPPKSPSSAK	N-Term(Thio-); K10(Thio-)	1175,542351
175	trypsin	TPPKSPSSAKSR	K4(Thio-); K10(Thio-)	1418,676503
175	trypsin	TPPSSGEPPKSGDR	K10(Thio-)	1499,678857
195	trypsin	SGYSSPGSPGTPGSR		1393,633509
195	trypsin	SGYSSPGSPGTPGSR	N-Term(Thio-)	1481,631528
212	trypsin	TPSLPTPPTR		1066,589387
212	trypsin	TPSLPTPPTREPK		1420,779217
222	trypsin	EPKKVAVVR	N-Term(Glu->pyro-Glu); K4(Thio-)	1095,632966
222	trypsin	EPKKVAVVR	N-Term(Thio-); K4(Thio-)	1201,64156
222	trypsin	EPKKVAVVR	N-Term(Glu->pyro-Glu); K3(Thio-); K4(Thio-)	1183,632043
241	trypsin	SRLQTAPVPMP		1196,646776
243	trypsin	LQTAPVPMP		953,5110772
243	trypsin	LQTAPVPMPDLK		1309,717648
243	trypsin	LQTAPVPMPDLK	M8(Oxidation)	1325,713448
243	trypsin	LQTAPVPMPDLK	K12(Thio-)	1397,717139
243	trypsin	LQTAPVPMPDLKN	K12(Thio-)	1511,759923
243	trypsin	LQTAPVPMPDLKN	M8(Oxidation); K12(Thio-)	1527,756562
243	trypsin	LQTAPVPMPDLKNVK	K15(Thio-)	1738,923951
243	trypsin	LQTAPVPMPDLKNVK	M8(Oxidation); K12(Thio-)	1754,917024
243	trypsin	LQTAPVPMPDLKNVKS	M8(Oxidation); K12(Thio-); K15(Thio-)	1929,947244
243	trypsin	LQTAPVPMPDLKNVKS	M8(Oxidation); K12(Thio-); K17(Thio-)	2058,0458
255	trypsin	NVSKIGSTENLK	K3(Thio-); K5(Thio-)	1593,797273
258	trypsin	SKIGSTENLK	K2(Thio-)	1164,591374
258	trypsin	SKIGSTENLK	N-Term(Acetyl); K2(Thio-)	1206,614862
258	trypsin	SKIGSTENLKHQPGGGK	N-Term(Thio-); K10(Thio-)	1913,919898
260	trypsin	IGSTENLKH	K8(Thio-)	1086,524566
260	trypsin	IGSTENLKHQPGGGK	K8(Thio-)	1610,792489
268	trypsin	HQPGGGKVQI	K7(Thio-)	1108,557297
268	trypsin	HQPGGGKVQII	K7(Thio-)	1221,641297
268	trypsin	HQPGGGKVQIIN	N-Term(Thio-)	1335,683325
268	trypsin	HQPGGGKVQIINK	K7(Thio-)	1463,776778
281	trypsin	KLDLSNVQSK	N-Term(Thio-)	1219,634055
282	trypsin	LDLSNVQSK		1003,541988
282	trypsin	LDLSNVQSKCGSK	K9(Thio-)	1466,697098

299	trypsin	HVPGGGSVQIV		1049,574115
299	trypsin	HVPGGGSVQIVY		1212,636397
299	trypsin	HVPGGGSVQIVYKPV		1536,852197
299	trypsin	HVPGGGSVQIVYKPVDSLK		1980,089466
312	trypsin	PVDLSKVTSK	K6(Thio-)	1161,618323
318	trypsin	VTSKCGSL	(Thio-); K4(Thio-); C5(Carbamido)	1027,430107
318	trypsin	VTSKCGSLGN	K4(Thio-)	1053,471192
322	trypsin	CGSLGNIHHKPGGGQVEVK		1916,974307
322	trypsin	CGSLGNIHHKPGGGQVEVK	K10(Thio-)	2004,970983
328	trypsin	IHHKPGGGQVEVK	K4(Thio-)	1473,762428
332	trypsin	PGGGQVEVKSEK	K9(Thio-)	1302,634295
341	trypsin	SEKLDFK	K3(Thio-)	954,4600626
341	trypsin	SEKLDFKDR	K3(Thio-); K7(Thio-)	1313,587368
350	trypsin	VQSKIGSLDN	K4(Thio-)	1148,561665
350	trypsin	VQSKIGSLDNIT	K4(Thio-)	1362,694245
350	trypsin	VQSKIGSLDNITH	K4(Thio-)	1499,750815
350	trypsin	VQSKIGSLDNITHVPGGGN	N-Term(Thio-)	1980,980083
350	trypsin	VQSKIGSLDNITHVPGGGNK	K4(Thio-)	2109,075564
350	trypsin	VQSKIGSLDNITHVPGGGNKK	K4(Thio-); K20(Thio-)	2325,166764
354	trypsin	IGSLDNITHVPGGGNK		1578,823457
354	trypsin	IGSLDNITHVPGGGNKK	K17(Thio-)	1794,915629
371	trypsin	IETHKLTFR	K5(Thio-)	1232,645197
380	trypsin	ENAKAKTDHGAEIVY	N-Term(Thio-); K4(Thio-)	1821,811084
380	trypsin	ENAKAKTDHGAEIVYK	K4(Thio-); K6(Thio-)	1949,908907
384	trypsin	AKTDHGAEI	K2(Thio-)	1029,468028
384	trypsin	AKTDHGAEIV	K2(Thio-)	1128,534986
384	trypsin	AKTDHGAEIVY	N-Term(Thio-)	1291,597159
384	trypsin	AKTDHGAEIVYK	N-Term(Thio-)	1419,693863
386	trypsin	TDHGAEIVYK	N-Term(Thio-)	1220,561022
386	trypsin	TDHGAEIVYKSPVVSGDTSPR	K10(Thio-)	2303,096234
407	trypsin	HLSNVSTGSDMVDSPQLA		2057,981254

III. Formation artéfactuelle d'un résidu pyroglutamate



IV. Curriculum vitae

Maxime DERISBOURG
 Born on January 13, 1986
 Inserm Jean Pierre Aubert Research Center
 UMR U837, Team 1 : « Alzheimer & Tauopathie »
 PhD student

m.derisbourg@gmail.com
 +33675599632
 Rue Michel Polonovski, 59045 Lille-cedex, France
 Team's Director : Luc BUEE
 PhD Supervisor : Malika HAMDANE

Research interests : Tau protein truncation and biology

Education

2011-present : PhD student at Jean Pierre Aubert Research Center, UMR U837-UL2, Team « Alzheimer & Tauopathies », granted by University hospital of Lille.
 2013 september : Animal experimentation certification, Institut Pasteur de Lille.
 2010-2011 : Post-graduate degree in Biologie and Health at Université de Lille 2.
 2009-2010 : Graduate degree in Biology and Biotechnology at Université de Lille 1.
 2006-2009 : Undergraduate degree in Biochemistry at Université de Lille 1.

Research experience

2010-2014 Master 2 Internship (1 year) and PhD fellowship at Jean Pierre Aubert Research Center, UMR U837-UL2, Team « Alzheimer & Tauopathies ». *Identification of Tau truncated species : toward their physio-pathological role in Alzheimer's disease and related Tauopathies.*

2009-2010 : Internship (4 weeks) at Unité de Glycobiologie structurale et fonctionnelle UMR-CNRS 8576, Université de Lille 1, Villeneuve d'ascq, France. *Involvement of the O-N-acetylglucosaminylation on Fatty Acid Synthase in hepatocyte cell line.* (Work supervised by Dr. Céline Guinez and Pr. Tony Lefebvre).

Lab techniques

Biochemistry : Protein extraction, fractionation, immuno-precipitation, mono- and bi-dimensional electrophoresis, western-blotting, enzymatic dosage.
 Cell biology: cell culture, transfection, infection (lentiviral vectors), immuno-cytochemistry, confocal imaging, ELISA.
 Molecular biology : DNA cloning, PCR, qPCR.

Publications

Derisbourg M, Leghay C, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F-J, Laurent C, Demeyer D, Buée-Scherrer V, Blum D, Vhin J, Sergeant S, Verdier Y, Buée L, Hamdane M. *Newly identified truncated Tau fragments highlight the role of N-terminal part of Tau in microtubule stabilization.* Submitted.

Fernandez-Gomez F-J, Jumeau F, **Derisbourg M**, Burnouf S, Tran H, Eddarkaoui S, Obriot H, Dutoit-Lefevre V, Deramecourt V, Mitchell V, Lefranc D, Hamdane M, Blum D, Buée L, Buée-Scherrer V, Sergeant N. *Consensus brain-derived protein, extraction protocol for the study of human and murine brain proteome using both 2D-DIGE and mini 2DE immunoblotting.* Journal of Visualized Experiments. April 2014.

Laurent C, Eddarkaoui S, **Derisbourg M**, Leboucher A, Demeyer D, Carrier S, Schneider M, Hamdane M, Müller C-E, Buée L, Blum D. *Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's Disease-like Tau pathology.* Neurobiology of Aging. March 2014

Van der Jeugd A, Vermaercke B, **Derisbourg M**, Lo A-C, Hamdane M, Blum D, Buée L, D'Hooge R. *Progressive age-related cognitive decline in Tau mice.* Journal of Alzheimer's Disease. June 2013.

Burnouf S, Martire A, **Derisbourg M**, Laurent C, Belarbi K, Leboucher A, Fernandez-Gomez FJ, Troquier L, Eddarkaoui S, Grosjean ME, Demeyer D, Muhr-Tailleux A, Buisson A, Sergeant N, Hamdane M, Humez S, Popoli P, Buée L, Blum D. *NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model*. Ageing Cell. October 2012.

Burnouf S, Belarbi K, Troquier L, **Derisbourg M**, Demeyer D, Leboucher A, Laurent C, Hamdane M, Buee L, Blum D. *Hippocampal BDNF expression in a Tau transgenic mouse model*. Current Alzheimer Research. May 2012.

Oral communications

Derisbourg M, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F, Laurent C, Demeyer D, Begard S, Colin M, Buée-Scherrer V, Sergeant N, Blum D, Vinh J, Verdier Y, Buée L, Hamdane M. *Identification of Tau truncated species : Towards deciphering their role in Alzheimer's disease*. Journée de la recherche. 2014, Lille.

Derisbourg M, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F, Laurent C, Demeyer D, Begard S, Colin M, Buée-Scherrer V, Sergeant N, Blum D, Vinh J, Verdier Y, Buée L, Hamdane M. *Identification of Tau truncated species : Towards deciphering their role in Alzheimer's disease*. Journée André Verbert. 2013, Lille. **Award for the best oral communication.**

Derisbourg M, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F, Laurent C, Demeyer D, Eddarkaoui S, Buée-Scherrer V, Schraen-Marschke S, Colin M, Sergeant N, Verdier Y, Blum D, Vinh J, Buée L, Hamdane M. *Identification of Tau truncated species and their role toward Tau pathology*. PhD students day. 2013, Lille.

Posters

Derisbourg M, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F, Laurent C, Demeyer D, S Eddarkaoui, Begard S, S Schraen-Maschke, Colin M, Buée-Scherrer V, Sergeant N, Blum D, Vinh J, Verdier Y, Buée L, Hamdane M. *Tau truncated species : From identification to functional studies*. Society for Neurosciences. 2013, San Diego.

Derisbourg M, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F, Laurent C, Demeyer D, Buée-Scherrer V, Sergeant N, Blum D, Vinh J, Verdier Y, Buée L, Hamdane M. *Identification of Tau truncated species by proteomics approach for studying their role in Tau pathology*. Jacques Monod Conference. 2013, Roscoff.

Hamdane M, **Derisbourg M**, Chiappetta G, Demeyer D, Eddarkoui S, Begard S, Schraen-Maschke S, Colin M, Vinh J, Buée-Scherrer V, Sergeant N, Blum D, Verdier Y, Buée L. *Functional characterization of an N-terminal truncated Tau specie*. Jacques Monod Conference. 2013, Roscoff.

Humez S, Burnouf S, Martire A, **Derisbourg M**, Laurent C, Muhr-Tailleux A, Buisson A, Sergeant N, Hamdane M, Popoli P, Buée L, Blum D. *NMDA receptor dysfunction contributes to impaired BDNF-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model*. AD/PD. 2013, Florence.

Derisbourg M, Fernandez-Gomez F, Laurent C, Demeyer D, Verdier Y, Chiappetta G, Vinh J, Buée-Scherrer V, Sergeant N, Blum D, Buée L, Hamdane M. *Identification of Tau truncated species and their role toward Tau pathology*. PhD students day. 2012, Lille.

Fernandez-Gomez F, Eddarkaoui S, H Oriot, F Jumeau, Leboucher A, Laurent C, **Derisbourg M**, Duban S, Flahaut C, Buée-Scherrer V, Hamdane M, Buée L, Blum D, Sergeant N. *An optimized 2D-DIGE protocol for the search of potential biomarkers in brains of Alzheimer's disease*. Society For Neuroscience. 2011, Washington.

Blum D, Burnouf S, Martire A, Belarbi K, Laurent C, Leboucher A, Fernandez-Gomez F-J, Troquiez L, **Derisbourg M**, Grosjean M-E, Demeyer D, Muhr-Tailleux A, Buisson A, Humez S, Sergeant N, Hamdane M, Popoli P, Buée L. *BDNF-dependent hippocampal synaptic enhancement in a Tau transgenic mouse model*. 2011.10th meeting of Société des Neurosciences. Marseille.

Hamdane M, Desmercieres J, **Derisbourg M**, Laurent C, Burnouf S, Troquier L, Lebocher A, Demeyer D, Becque S, Grosjean ME, Caillierez R, Brion I, Fernandez-Gomez F, Sergeant N, Blum D, Buée L. *Biochemical characterization of protein degradation pathways in a transgenic model of Tau pathology (THY-Tau22 mice)*. Society For Neuroscience. 2010, San-Diego.