

Université de Lille

École doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

## **THÈSE**

Présentée par

**Thomas Rico**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE**

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

# **Implication de la protéine tau dans les mécanismes de réparation de l'ADN et résistance thérapeutique dans les cancers**

Soutenue publiquement le **27 octobre 2021** devant le jury composé de :

**Mme le Dr. Mounira Amor-Guélet**

**Rapportrice**

**Mme le Dr. Josée Guirouilh-Barbat**

**Rapportrice**

**M le Pr. Claude-Alain Maurage**

**Président du jury**

**M le Dr. Pierre Dourlen**

**Invité**

**M. le Dr. Bruno Lefebvre**

**Directeur de thèse**



**À toutes celles et ceux qui, chaque jour,  
se battent contre la maladie.**



## REMERCIEMENTS

Avant tout, je souhaite remercier La Ligue Contre le Cancer et leurs donateurs pour leur générosité et la confiance qu'ils placent en nous. Merci pour ce soutien indéfectible. Je remercie également l'université de Lille pour le financement de ce travail de thèse.

Je souhaite exprimer ma gratitude aux membres de mon jury, le docteur **Mounira Amor-Guéret**, le docteur **Josée Guirouilh-Barbat**, le professeur **Claude-Alain Maurage** et le docteur **Pierre Dourlen** pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je souhaite également remercier les docteurs **Bernard Lopez** et **Éric Adriaenssens** qui ont accepté de faire partie de mon CSI. Merci à vous, Bernard Lopez, d'avoir apporté vos connaissances sur la réparation de l'ADN et en particulier sur la NHEJ – j'espère que ce manuscrit vous fera honneur. Merci à vous Éric Adriaenssens, pour tous vos conseils et aides pour des protocoles, matériels ou manip pendant ces trois années de thèse.

Je tiens maintenant à remercier le docteur **Luc Buée**. Merci pour votre accueil au sein de l'équipe Alzheimer & tauopathies. Merci pour votre professionnalisme, vos conseils scientifiques, votre aide, la confiance que vous placez en nous et pour votre faculté d'avoir des questions à toutes nos réponses qui, malgré tout, nous poussent vers l'avant.

Je voudrais vous remercier vous, **Bruno**, mais par où commencer ? Tout d'abord, merci d'avoir eu confiance en moi dès mon arrivée en master 1 et de m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de l'équipe. Cette confiance a rendu possible cette thèse. Plus encore, celle-ci n'aurait pu se dérouler dans de si bonnes conditions si vous n'aviez pas donné autant de votre temps et de votre énergie pour m'aider (surtout avec vos 150 relectures de ce manuscrit). Je suis venu dans cette équipe pour « faire de la neuro ». Vous m'avez proposé de travailler sur un sujet de cancérologie. C'est de loin la meilleure chose qui me soit arrivée pour cette thèse. Donc merci pour ça ! Enfin, j'espère que vous allez continuer à entretenir cette science de la vanne qui vous caractérise si bien et en espérant que vous ne m'en voulez plus de ne pas avoir prolongé mon contrat. Toutes les bonnes histoires ont une fin.

Je tiens à remercier chaleureusement **Marie- « Christine » Galas**, membre de notre groupe « tau dans l'noyau ». Je salue votre disponibilité ainsi que votre curiosité scientifique qui nous ont permis d'avancer dans nos projets. L'expérience scientifique que vous avez et que vous avez su transmettre m'ont permis de prendre du recul afin d'approcher les problèmes scientifiques sous différents angles.

Je tiens à remercier l'ensemble des chercheurs de l'équipe : **Valérie, David, Morvane, Didier, Sophie H, Nicolas, Malika, Vincent** pour vos nombreuses critiques lors des réunions de labo.

**Sabiha**, je ne ferai pas l'étalage des qualités professionnelles qui te sont attribuées : beaucoup l'ont fait et je suis certain que tu les connais. J'insisterai donc sur tes qualités humaines : ton dévouement, ton altruisme et ta sympathie inspirent le respect ! Je suis plus qu'heureux de t'avoir rencontrée. **Raphaëlle**, merci ! Merci d'avoir consacré autant de ton temps à réaliser avec moi toute la partie *in vivo* de ce projet. Tu as été une formidable compagnie pendant les longues demi-journées de mesures. Je te souhaite bon courage pour la suite ! Je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle maison. Je tiens à remercier particulièrement **Séverine**, pour l'aide et la disponibilité dont tu as fait preuve pour les infections virales. **Sébastien**, je suis fier d'avoir été un court temps ton binôme dans la responsabilité de la pièce bactériologique.

Merci à **Émilie, Anna, Ouada** pour votre sympathie et bonne humeur. Aux anciens, **Mélissa**, merci pour le temps passé à me former et à tout ce que tu as pu me transmettre. **Florian, Mégane** et **Clément, Caro** pour l'accueil et le soutien. A mon successeur, bon courage !

**Thomas C, Marine**, c'est avec une certaine tristesse que je quitte ce bureau. Les talents de ventriloque de Thomas (ceux qui le côtoient suffisamment ont forcément des voix et imitations farfelues en tête) suivis du rire « ... » (complétez « ... » par l'adjectif que vous voulez, ça marchera obligatoirement) de Marine, résonneront en moi longtemps. Merci de m'avoir suivi et lancé dans toutes ces discussions philosophiquement scientifiques ! Merci pour votre soutien, notamment et en particulier (parce que vous l'aimez cette expression, n'est-ce pas ?) pendant la fin de ma thèse, pour les nombreuses relectures de mon manuscrit, et les dernières manips urgentes ... voilà voilà.

Malgré ton anglais impeccable, non, **Marie**, la phrase « mice from age 6 to 12 ... » ne veut pas dire « le fromage des souris 6 à 12 ... ». Voilà je t'ai affichée ! Bon, je ne vais pas faire le malin, je n'ai même pas le TOEIC ... Bien joué en tout cas, tu auras été la première à publier ! Bon courage pour ta vie de chercheuse (n'abandonne pas pendant tes post-doc, tu es la seule résistante qui continue de faire vivre la recherche académique). Un grand merci pour nous avoir permis de faire de superbes schémas pour nos manuscrits ! Et surtout, un immense merci pour toutes les fois où tu m'as rappelé les deadlines qu'on devait respecter ... Sans toi, je serai encore en D1 !

**Élodie**, ton énergie et ta faculté à vouloir aller boire un verre toutes les 9 secondes environ m'impressionneront toujours. Quand j'écris ces lignes, j'ai ces voix très étranges que tu faisais avec Thomas B, super, ça va me rester en tête maintenant ! Plus sérieusement, je te souhaite bon courage pour ton tour du monde et pour ton ouverture de magasin où tu vendras des trucs que tu auras cousus toi-même.

**Georgia**, kalimera ! I don't know what's the greek for « farewell and good luck » ... Je continue en français parce que je sais que tu le lis bien maintenant. Tu as réussi en trois ans à faire une thèse de sciences et parler le français. Je ne sais pas ce qui a été le plus dur pour toi, mais félicitations !

Merci aux jeunes docteurs, **Kévin, Sarah G**, nos mentors à tous. Merci de nous avoir inspirés encore quelques temps après votre thèse. **Sarra**, tellement d'énergie dans une si petite chose ... **Hamza**, courage ! Un jour, tu ne travailleras plus les weekends et tu pourras aller au parc avec ta fille ! La thèse est bientôt terminée ! Force à toi. À la relève, **Thibaut, Agathe, Ilda**, courage à vous !

À **Thomas B**, même si on porte le même prénom, le fait de m'avoir répété le tien à chaque fois que je te croisais fait que je suis sûr de ne jamais oublier le mien. À méditer. **Bryan**, je te dis peut-être à bientôt dans un labo au Lux ! Merci à **Pierre** pour ces nombreuses discussions autour du maraîchage et de la vie en pleine nature !

Un immense merci aux filles du secrétariat **Céline, Nathalie, Sophie L, Betty** qui nous a rejoint récemment et sans oublier **Michèle**. Un grand merci également à **Thomas K** (c'est bon, le dernier Thomas est cité), **Karim** et **Laïfa**. Sans vous tous, le labo ne tournerait simplement pas, sans vous, on ne pourrait rien produire. Donc merci beaucoup !

Je tiens à remercier mes collègues de CANTHER : **Nathalie J**, merci pour ton dynamisme à toute épreuve et ton expertise de la cytométrie de flux qui nous permet de réaliser les manips de la meilleure des façons (avec tous les contrôles, bien entendu). **Émilie F**, qui complète parfaitement bien Nathalie, merci pour ta disponibilité, ton écoute et pour ta faculté à trouver des solutions à nos problèmes. **Jérôme K** (et sa team « métabolisme mitochondrial »), merci pour les conseils qui nous ont permis d'avancer à un moment où nos connaissances scientifiques bloquaient nos avancées. J'en profiterai pour remercier **Raeeka** et **Anne**, qui ont été très présentes pour donner leur soutien, ainsi que les meilleurs protocoles. Enfin, je voudrais remercier **Quentin**, toujours prêt à dépanner un protocole, un produit ou une astuce de manip. Bon courage pour la suite ! Je tiens également à remercier **Marie D**, qui m'a appris à irradier et m'a apporté pleins de conseils.

À la microscopie, merci à toi **Meriem**, pour ta bienveillance et ton écoute. **Antonino**, je voudrais te remercier pour ta gentillesse et tes macros de quantification. Ta faculté de traduire n'importe quel langage humain en langage binaire m'aura impressionné durant toutes mes années passées au labo.

Enfin, je suis hautement redevable à 7000 générations d'ancêtres qui, malgré les cruautés qui existent dans ce monde, ont réussi à se reproduire avant de mourir et ont rendu possible mon existence et donc celle de cette thèse. Ne les connaissant pas tous personnellement, je me contenterai de remercier les 0,00014% connus : mes **parents**. Merci d'avoir été un modèle de travail et de rigueur pour moi. Je ne pourrais compter les fois où vous m'avez poussé, dès mon plus jeune âge, à me lever du canapé et de m'atteler à la tâche. Malgré un faible taux de réussite – je sais persévérer, même dans la connerie – cela s'est ancré en moi et m'a indéniablement transmis la valeur du travail. Merci ! **Mamie**, merci pour ton sourire et ces dimanches sucrés depuis tant d'années. Aux deux personnes qui ont les génomes les plus proches du mien (**Clara, Sarah**, c'est de vous qu'il s'agit hein), force à vous de me supporter même quand je suis « en forme ». À **Jo, Vincent**, force à vous pour les supporter elles ...

A ma **belle-famille Meusienne**. Merci à vous de m'avoir accueilli dans ce petit brin de campagne pendant ces dernières années. Maintenant, va falloir me supporter à quelques pas de chez vous. Je souhaite remercier **Nono** et **Ninie** qui ont passé 98,6% de leurs soirées en visio avec nous (les 1,4% restants c'est quand on était à Rupt ...). Plus sérieusement vous êtes individuellement géniales. Les trois réunies par contre, c'est intenable ... À mon beaufrère crevard pouilleux **Adrien**. Merci d'avoir fait front avec moi face aux jumelles qui, on le sait, peuvent nous mener la vie dure ... Que la force soit avec toi pour tes legos. J'en profite pour remercier tout spécialement le parachutiste **Valentin Loliaux**, le premier à m'avoir donné le titre de docteur et qui a su apporter humour et divertissement en revenant du front chaque jour au premier confinement.

À mon confrère depuis tant d'années, **Maxime**. Je t'ai rencontré au moment où j'ai commencé à étudier les sciences de la vie (les sciences de la vie de PACES ...). Neuf années de sciences ont passé et tu es toujours là. Donc merci pour ça ! Bravo pour ton parcours tu peux être fier de toi ! Et très content que tu aies trouvé **Marine**, même si Le Havre n'est pas la plus belle ville du monde, elle est chouette !

« Eul' scientifique » voudrait remercier **Damien, Élia** et **Ophélie** (j'ai mis les prénoms dans l'ordre alphabétique donc, pas de jaloux). Comment écrire des remerciements de thèse sans penser à vous ? Je suis plus qu'heureux qu'une grande saucisse Meusienne m'ait un jour amené à Inor. Merci à **Romane** et **Steeve**, pour le vin (quand je ne conduis pas) et les plats raffinés.

Enfin, **Johanna**, ça y est, c'est fini, enfin ! Je sais qu'il t'a été difficile de quitter ta terre de cœur pour me rejoindre. Néanmoins, je te suis éternellement reconnaissant de l'avoir fait, et j'espère pouvoir te le rendre un jour. Tu as été et restes un soutien inestimable pour moi. À nous maintenant la vie, la vraie, loin de la fureur urbaine, près de la nature pour de nouvelles choses à planter, de chemins à fouler et petits chats à adopter.

# RÉSUMÉ

La résistance thérapeutique est un des enjeux majeurs dans le traitement des cancers. Ces derniers peuvent présenter une résistance intrinsèque ou qui peut être acquise pendant le traitement. Dans ce contexte, la protéine tau, codée par le gène *MAPT*, pourrait s'avérer être un contributeur important dans la résistance aux thérapies anti-cancéreuses. Initialement décrite au niveau neuronal, une littérature abondante a maintenant démontré que l'expression de son gène est augmentée dans plusieurs types de cancers et pouvait être associée à une résistance aux taxanes. Cet effet a été associé à son rôle bien connu de régulateur de l'assemblage et désassemblage des microtubules. Cependant, des travaux récents ont montré, au niveau neuronal, que tau était une protéine pléiotrope, impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires. Parmi eux, ses rôles dans la protection du génome et le maintien de la structure la chromatine peuvent être directement liés à une résistance à d'autres traitements anti-cancéreux.

Dans le premier objectif de cette thèse, nous mettons en évidence un effet de résistance de tau à la bléomycine et à l'irradiation par rayons X. Dans des cellules MCF7 et MDA-MB-231 exprimant *MAPT* de manière endogène, les cassures double brin de l'ADN générées par ces traitements disparaissent plus rapidement que dans leurs homologues transfectées stablement avec un shRNA dirigé contre tau (shTau). Nous avons pu expliquer cet effet par une augmentation des activités de réparation des cassures double brin de type jonction des extrémités non-homologues (NHEJ) et de recombinaison homologue (HR) dans les cellules tau-positives. D'un point de vue mécanistique, nous avons établi que tau favorise le transport microtubulaire de la protéine 53BP1 vers le centrosome améliorant ainsi sa translocation nucléaire. Enfin, en réalisant des xénogreffes des différents clones MCF7 dans un modèle de souris immunodéficiente (SCID), nous avons confirmé *in vivo* que la protéine tau était un facteur de résistance à la radiothérapie et la chimiothérapie induisant des cassures double brin (doxorubicine) et que la diminution de son expression par shRNA améliore l'effet de ces traitements.

Dans le deuxième objectif de cette thèse, nous démontrons que tau limite l'effet de remodelage de la chromatine et de réexpression de gènes induit par un inhibiteur d'histone déacétylase (TSA). De plus, nous avons trouvé que tau reconnaît et lie spécifiquement les histones H3 et H4 en absence de modifications post-traductionnelles ou l'histone H4 acétylée. Corroborant les altérations de la chromatine observées dans les neurones de la dégénérescence lombaire frontotemporale, des mutations de tau suppriment la liaison de tau aux histones et n'altèrent pas le remodelage de la chromatine induite par la TSA. Enfin, nous avons démontré que l'interaction entre tau et les histones empêchent de nouvelles modifications post-traductionnelles de H3 induites par le traitement de TSA et maintien la compaction de la chromatine.

Dans le troisième objectif de cette thèse, nous montrons que l'expression de *MAPT* dans différentes lignées de cancers mammaires est associée à une diminution du stress oxydant basal et d'un stress mitochondrial induit par la ménadione et général induit par l'hydroperoxyde de tert-butyle. Nous avons trouvé une colocalisation entre tau et la mitochondrie en condition basale et de stress induit. De plus, la morphologie et la localisation mitochondriales sont modifiées par tau et peuvent constituer un mécanisme de résistance au stress oxydant.



## ABSTRACT

Therapeutic resistance is one of the major challenges in cancers treatment. These can display an inherent resistance of acquired during treatment. In this context, the tau protein encoded by the *MAPT* gene, could be an important contributor to anticancer therapy resistance. Initially described at the neuronal level, an abundant literature has now demonstrated that its expression was increased in several types of cancer and may be associated with acquired taxane resistance. This effect seems to be related to its well-known role in regulating microtubules assembly/disassembly. However, recent works have shown that tau at the neuronal level is a pleiotropic protein, involved in different cellular mechanisms. Among them, its role in genome protection and the maintenance of chromatin structure can be linked to a resistance to other anticancer treatment.

In the first objective, we highlight a resistance effect of tau to bleomycin and X-rays irradiation. In MCF7 and MDA-MB-231 cells expressing endogenous *MAPT*, treatments-induced DNA double strand breaks disappear faster than cells stably transfected with a shRNA targeting tau (shTau). We have explained this effect by an increase of non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) DNA repair activities in tau-positive cells. Mechanistically, we have established that tau enhances 53BP1 transport on microtubules towards the centrosome and its nuclear translocation. Finally, by using MCF7 clones' xenografts on immunodeficient mice (SCID), we have confirmed in vivo that tau protein is a resistance factor to radiotherapy and chemotherapies-induced double strand breaks (doxorubicin) et that shRNA-induced expression decrease enhances these treatments efficiency.

In the second objective, we demonstrate that tau prevents chromatin remodeling and gene re-expression induced by a histone deacetylase inhibitor (TSA). Moreover, we have found that tau recognizes and binds specifically histones H3 and H4 with no post-translational modifications or acetylated histone H4. Concomitant with chromatin alterations observed in frontotemporal lumbar degeneration, tau mutations disrupt its interaction with histones and supresses TSA-induced chromatin remodeling. Finally, we have demonstrated that tau-histones interaction prevents further H3 post-translational modifications by TSA and maintain the chromatin compaction.

In the third objective, we show that *MAPT* expression in different breast cancer cell lines is associated with a decrease of basal oxidative stress and menadione-induced mitochondrial stress and tert-butyl hydroperoxide-induced global stress. We have found a colocalization between tau and mitochondria in basal and stress-induced conditions. Moreover, mitochondria morphology and localization are modified by tau and could be an oxidative stress resistance mechanism.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	5
<b>RÉSUMÉ</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	10
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	13
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	15
<b>INTRODUCTION</b> .....	19
<b>CHAPITRE 1 :</b> .....	20
<b>Physiologie et pathologie de la protéine tau</b> .....	20
1. Généralités sur tau .....	21
a. Le gène <i>MAPT</i> .....	21
i. Généralités.....	21
ii. Expression .....	22
b. Les protéines tau.....	24
i. Structure primaire.....	24
ii. Autres structures et conformation spatiale .....	26
iii. Fonction microtubulaire de la protéine tau.....	26
2. Implication de la protéine tau dans deux pathologies.....	29
a. Les maladies neurodégénératives.....	30
i. Alzheimer et tauopathies .....	30
ii. Fonctions non-microtubulaires de la protéine tau .....	32
1. Modulation de la voie de l'insuline .....	32
2. Neurogenèse et fonction neuritique.....	33
3. Protéine tau et acides nucléiques .....	33
4. Chromatine et protéine tau .....	34
b. Les cancers .....	36
i. Mécanismes de surexpression de <i>MAPT</i> .....	38
1. La stimulation oestrogénique .....	38
2. La stimulation par le NGF.....	39
3. Régulation épigénétique de l'expression de <i>MAPT</i> .....	41
ii. Quelles espèces de tau retrouve-t-on dans les cancers ?.....	43
iii. Les fonctions établies ou potentielles des protéines tau dans les cancers .....	44

1.	Effets de tau sur la croissance tumorale .....	44
a.	PI3k/Akt : la voie de l'insuline.....	44
b.	Tau et les MAP-kinases.....	47
c.	Évasion métastatique et invasion tissulaire .....	49
d.	Protéine tau et angiogenèse .....	51
<b>CHAPITRE 2 :</b>	.....	<b>55</b>
<b>La protéine tau et la résistance thérapeutique.....</b>	.....	<b>55</b>
1.	Généralités sur les thérapies et les résistances.....	56
2.	Les poisons du fuseau mitotique .....	59
a.	Les thérapies.....	59
i.	Les stabilisateurs des microtubules : taxanes et épothilones .....	60
ii.	Les déstabilisateurs des microtubules : les vinca-alcaloïdes .....	63
b.	Les résistances.....	64
i.	Isoformes $\beta$ III et mutations de la tubuline.....	64
ii.	Présence de protéines associées aux microtubules .....	65
1.	Les protéines MAP2, MAP4 et stathmine .....	65
2.	La protéine tau et la résistance aux taxanes.....	66
3.	Les thérapies endommageant l'ADN .....	69
a.	Les chimiothérapies à base de DDA .....	70
i.	Les antimétabolites.....	70
ii.	Les agents alkylants.....	71
iii.	Les inhibiteurs de topoisomérase .....	72
iv.	Les radiomimétiques .....	74
b.	La radiothérapie à base de rayonnements ionisants.....	75
c.	La résistance à l'endommagement de l'ADN : mécanismes de réparation des CDB.....	76
i.	Généralités sur la réparation des cassures de l'ADN.....	77
ii.	La réparation par jonction des extrémités non-homologues.....	80
1.	Mécanisme.....	80
2.	Un mécanisme <i>error prone</i> ou <i>error free</i> ?.....	81
3.	Résistance thérapeutique .....	83
iii.	La réparation par recombinaison homologue .....	84
1.	Mécanisme.....	84
2.	Un mécanisme <i>error free</i> ou <i>error prone</i> ?.....	85
3.	Résistance thérapeutique .....	86
iv.	Implication de la protéine tau dans la stabilité génomique.....	87
4.	Les inhibiteurs de HDAC et les altérations épigénétiques .....	91

a. Les thérapies.....	92
b. Les résistances.....	93
5. Le stress oxydant : un mécanisme commun à plusieurs thérapies.....	94
a. Les thérapies induisant un stress oxydant.....	98
b. La résistance au stress oxydant.....	101
<b>OBJECTIFS</b> .....	106
<b>DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE</b> .....	111
<b>RÉSULTATS</b> .....	112
<b>Étude 1</b> : implication de la protéine tau dans les mécanismes de réparation de l'ADN dans les cancers et résistance aux DDA et à la radiothérapie .....	113
1. Introduction .....	114
2. Matériel et méthodes .....	114
3. Résultats .....	121
4. Discussion .....	134
<b>Étude 2</b> : effet de tau sur l'organisation de la chromatine et résistance à la trichostatine A (TSA).....	142
1. Introduction .....	143
2. Material & methods.....	144
3. Results .....	149
4. Discussion .....	164
5. References .....	172
<b>Étude 3</b> : effet de la protéine tau dans la régulation du stress oxydant et implications dans la résistance thérapeutique à différents traitements.....	188
1. Introduction .....	188
2. Matériel et méthodes .....	188
3. Résultats .....	190
4. Discussion .....	198
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE</b> .....	201
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	216
<b>ANNEXES</b> .....	256

## ABRÉVIATIONS

<b>AA</b> : Acide Aminé	<b>NGF</b> : Nerve Growth Factor
<b>ADN</b> : Acide Désoxyribonucléique	<b>NHEJ</b> : Non-Homologous End Joining
<b>ARN</b> : Acide Ribonucléique	<b>PD</b> : Pick's Disease
<b>CBD</b> : Corticobasal Dementia	<b>PHF</b> : Paired Helical Filaments
<b>CDB</b> : Cassures Double Brin	<b>PI3K</b> : Phosphoinositide 3-Kinase
<b>CSB</b> : Cassures Simple Brin	<b>PRD</b> : Proline Rich Domain
<b>CTCF</b> : CCCTC binding factor	<b>CIMP</b> : CpG island methylator phenotype
<b>DDA</b> : DNA Damaging Agents	<b>pCR</b> : pathological Complete Response
<b>EGF</b> : Epidermal Growth Factor	<b>5-FU</b> : 5-Fluorouracil
<b>ER</b> : Estrogen Receptor	<b>6-MP</b> : 6-mercaptopurine
<b>FTDP-17</b> : Frontotemporal Dementia and Parkinsonisms linked to chromosome 17	<b>6-TG</b> : 6-thioguanine
<b>GBG</b> : Gliomes de Bas Grade	<b>MMR</b> : Mismatch Repair
<b>HAT</b> : Histone Acétyltransférase	<b>CTCL</b> : Cutaneous T-Cell Lymphoma
<b>HDAC</b> : Histone Deacetylase	<b>PTCL</b> : Peripheral T-Cell Lymphoma
HDACi : Histone Deacetylase inhibitors	<b>BS</b> : Bloom' syndrome
<b>HMT</b> : Histone Méthyltransférase	<b>DDR</b> : DNA Damage Response
<b>HPC</b> : Hétérochromatine Péricentromérique	<b>FDA</b> : Food and Drug Administration
<b>HR</b> : Homologous Recombination	<b>HDR</b> : Homology Directed Repair
<b>IGF</b> : Insulin Growth Factor	<b>SSA</b> : Single Strand Annealing
<b>ERE</b> : Estrogen Element Response	<b>HP1</b> : heterochromatin protein 1
<b>ER</b> : Estrogen Receptor	<b>EROs</b> : espèces réactives de l'oxygène
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b> : Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$	<b>MTX</b> : méthotrexate
<b>KO</b> : knock-out	<b>SOD</b> : Superoxide Dismutase
<b>MAPK</b> : Mitogen Activated Protein Kinase	<b>OMM</b> : Outer Mitochondrial Membrane
<b>MAPs</b> : Microtubule Associated Proteins	<b>IMS</b> : Inner Membrane Space
<b>MAPT</b> : Microtubule-associated protein tau	<b>NOX</b> : NAD(P)H Oxidases
<b>MBD</b> : Microtubule Binding Domain	<b>HPRT</b> :Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransférase
<b>McTN</b> : Microtentacule	<b>PSP</b> : Progressive Supranuclear Salsy
<b>SNC</b> : Système Nerveux Central	<b>PTEN</b> : Phosphatase and TENSine homologue on chromosome 10
<b>SNP</b> : Système Nerveux Périphérique	<b>TSA</b> : Trichostatine A
<b>MTA</b> : Microtubule Targeting Agents	<b>IDH1/2</b> : isocitrate déshydrogénase 1/2
<b>NFT</b> : Neurofibrillary Tangles	

**VA** : Vinca-Alcaloïdes

**LINAC** : Linear Particles Accelerator

**OS** : Overall Survival

**shRNA** : small hairpin RNA

**siRNA** : small interfering RNA

**miR** : micro RNA

**VBL** : Vinblastine

**VCR** : Vincristine

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**VRL** : Vinorelbine

**WT** : wild-type

# LISTE DES FIGURES

## INTRODUCTION

<b>Figure 1.</b> Gène, transcrit primaire et isoformes possibles de tau .....	24
<b>Figure 2.</b> Les épitopes phosphorylables de la protéine tau 2N4R .....	25
<b>Figure 3.</b> Représentation de l'interaction entre la protéine tau et le microtubule stabilisé.....	27
<b>Figure 4.</b> La protéine tau inhibe la kinésine de type 1, augmente la liaison dynéine-microtubule et favorise le transport rétrograde.....	29
<b>Figure 5.</b> Mécanismes d'agrégation de protéines tau et neurodégénérescence .....	31
<b>Figure 6.</b> Synthèse des mécanismes moléculaires formant l'euchromatine ou l'hétérochromatine .....	35
<b>Figure 7.</b> Expression de MAPT dans les cancers. ....	38
<b>Figure 8.</b> Implication du NGF dans l'expression de MAPT.....	40
<b>Figure 9.</b> Mécanisme d'expression de MAPT dans les gliomes de bas grade.....	42
<b>Figure 10.</b> Implication de la protéine tau dans l'activation constitutive de la voie de signalisation PI3k/Akt .....	45
<b>Figure 11.</b> Les voies des MAP-kinases. ....	47
<b>Figure 12.</b> Modèle de l'implication de la protéine tau dans la formation des microtentacules nécessaires au processus métastatique .....	50
<b>Figure 13.</b> Effet de tau dans le processus d'angiogenèse dans les gliomes de bas grade. ....	52
<b>Figure 14.</b> Évolution des thérapies anti-cancéreuses.....	57
<b>Figure 15.</b> Mécanismes de résistance thérapeutiques généraux. ....	59
<b>Figure 16.</b> Mécanisme d'arrêt du cycle par les MTA.....	61
<b>Figure 17.</b> Trafic intracellulaire de protéines de réparation de l'ADN par la dynéine .....	62
<b>Figure 18.</b> Première évidence d'un effet compétiteur de tau avec un agent ciblant les microtubules..	66
<b>Figure 19.</b> Les thérapies endommagement l'ADN.....	74
<b>Figure 20.</b> Le nucléosome de la NHEJ et de la HR .....	79
<b>Figure 21.</b> Mécanismes de réparation des CDB par NHEJ et HR. ....	85
<b>Figure 22.</b> Effet de la TSA sur l'organisation de la chromatine.....	93
<b>Figure 23.</b> Origines du stress oxydant. ....	96
<b>Figure 24.</b> Paradoxe du stress oxydant : favorable et défavorable à la progression tumorale.....	98
<b>Figure 25.</b> Relation entre la dynamique mitochondriale et la résistance au stress oxydant.....	102

## RÉSULTATS

## **Étude 1 : implication de la protéine tau dans les mécanismes de réparation de l'ADN dans les cancers et résistance aux DDA et à la radiothérapie**

<b>Figure 1.</b> Expression de MAPT dans deux lignées de tumeurs mammaires.....	121
<b>Figure 2.</b> Évolution des CDB après un traitement à base de bléomycine.....	122
<b>Figure 3.</b> Évolution des CDB après un traitement à base de rayons X.....	124
<b>Figure 4.</b> Détection de la réparation NHEJ dans des cellules HeLa transfectées ou non avec tau par cytométrie de flux.....	126
<b>Figure 5.</b> Distribution cytosolique et nucléaire de 53BP1 après irradiation en présence ou non de tau .....	127
<b>Figure 6.</b> Colocalisation entre 53BP1 et les microtubules après irradiation.....	128
<b>Figure 7.</b> Colocalisation entre 53BP1 et les microtubules après un traitement bléomycine.....	129
<b>Figure 8.</b> Effet de tau sur la stabilité génomique.....	131
<b>Figure 9.</b> Évolution tumorale après traitement pour les MCF7 shCtrl et shTau.....	133
<b>Figure 10.</b> Modèle de l'effet de tau sur le transport rétrograde de la protéine 53BP1 et implications dans la résistance thérapeutique.....	139
<b>Figure supplémentaire 1.</b> ELISA et RT-qPCR sur MCF7.....	140
<b>Figure supplémentaire 2.</b> Détection de la protéine Tau dans les fractions solubles et insolubles du noyau en présence ou non de dommages à l'ADN.....	140
<b>Figure supplémentaire 3.</b> Test de survie des cellules MCF7 shCtrl et shTau après un traitement aux rayons X. ....	141

## **Étude 2 : effet de tau sur l'organisation de la chromatine et résistance à la trichostatine A (TSA)**

<b>Figure 1.</b> Tau inhibition increases MCF7 breast cancer cell line sensitivity to TSA. ....	150
<b>Figure 2.</b> Tau expression prevented TSA-dependent chromatin remodeling.....	152
<b>Figure 3.</b> Histone H3 acetylation and Tau occupancy at different promoters.....	155
<b>Figure 4.</b> Tau4R is associated with condensed chromatin.....	157
<b>Figure 5.</b> Tau4R binds directly to histones.....	159
<b>Figure 6.</b> Frontotemporal lobar degeneration Tau mutations disrupt its interaction with histones ....	160
<b>Figure 7.</b> Tau4R increases chromatin compaction. ....	163
<b>Figure 8.</b> Proposed model for the role of Tau on chromatin. ....	167
<b>Supplementary figure 1.</b> Single confocal sections of MCF7 wt, MCF7 stably transfected with plasmids encoding shctrl or shTau. ....	180
<b>Supplementary figure 2.</b> Tau inhibition increases MDA-MB-231 breast cancer cell line sensitivity to TSA .....	181
<b>Supplementary figure 3.</b> Rate of H3K9 methylation and HP1a expression after TSA treatment.....	182



<b>Supplementary figure 4.</b> Tau4R but not Tau3R isoforms are tightly bound to chromatin .....	183
<b>Supplementary figure 5.</b> Tau did not prevent H3 acetylation in vitro .....	184
<b>Supplementary figure 6.</b> Chromatin of Tau expressing cells is less accessible to MNase after TSA treatment .....	185
<b>Supplementary figure 7.</b> Effect of Tau4R or TauP301L on PCH structure under BIX 01294 treatment. ....	186
<b>Supplementary figure 8.</b> Absence of ectopic tethered Tau4R effects of on integrated reporter plasmid displaying high basal luciferase activity.....	187
<b>Supplementary table 1.</b> Interaction between Tau4R and different oligonucleotides assessed by microscale thermophoresis. ....	187

**Étude 3 : effet de la protéine tau dans la régulation du stress oxydant et implications dans la résistance thérapeutique à différents traitements**

<b>Figure 1.</b> Effet de tau sur le stress oxydant.....	191
<b>Figure 2.</b> Colocalisation entre tau et la mitochondrie.....	192
<b>Figure 3.</b> Localisation des mitochondries dans les HCC1954 GFP et Tau-GFP.....	194
<b>Figure 4.</b> Interactions entre RE et mitochondrie dans les MCF7 shCtrl et shTau.....	195
<b>Figure 5.</b> La protéine Drp1 est absente dans les cellules tau-positives. ....	197

**DISCUSSION**

<b>Figure 1.</b> Implications de la protéine tau dans la résistance thérapeutique et l’agressivité des cancers .....	205
--	-----

**ANNEXES**

<b>Figure annexe 1.</b> Présence de 53BP1 nuclear bodies dans les MCF7 shCtrl et shTau .....	257
<b>Figure annexe 2.</b> Présence d’anaphase bridges dans les MCF7 shTau .....	258

:

# **INTRODUCTION**

## **CHAPITRE 1 :**

### **Physiologie et pathologie de la protéine tau**

#### **De la neurodégénérescence à la croissance**

En 1975, l'équipe de Marc W. Kirschner isola, à partir de cerveau de porcs, une protéine capable de polymériser in vitro des monomères de tubuline en microtubules. Ils proposèrent alors d'appeler cette protéine  $\tau$  (tau) pour sa capacité à induire la formation de tubules (Weingarten et al., 1975). Près de quarante-cinq ans plus tard, cette protéine fait l'objet d'intenses études. En effet, son implication dans une pléiade de maladies neurodégénératives appelées tauopathies a permis à la communauté scientifique de lui attribuer de nouveaux rôles au sein de la cellule. De surcroît, son expression, initialement décrite au niveau neuronal, a été relatée dans des cellules non-neuronales en conditions physiologiques ainsi que dans certains tissus tumoraux.

L'introduction de ce manuscrit commence par un état des connaissances actuelles sur tau. Il y sera décrit, dans un premier temps, la séquence du gène codant tau et ses variants protéiques, les différentes fonctions qu'elle assure ainsi que son implication dans certains contextes neurodégénératifs. Puis, dans un second temps, il sera décrit les rôles avérés ou potentiels de tau dans différents types de cancers. En effet, l'expression de *MAPT*, le gène codant les protéines tau, peut jouer différents rôles dans les tumeurs.

## 1. Généralités sur tau

### a. Le gène *MAPT*

#### i. Généralités

Le gène *MAPT* (*Microtubule-Associated Protein Tau*) qui code à lui seul les protéines tau, est localisé sur le bras long du chromosome 17, au locus q21.31 (Neve *et al.*, 1986). D'une longueur de 134 kb, il est composé de 15 exons numérotés de 0 à 13. Certains de ces exons sont codants quand d'autres ne le sont pas. Par exemple, l'exon E0 retrouvé dans la région promotrice du gène, est transcrit mais reste totalement non codant (figure 1A). À ce même locus, se trouvent au moins quatre autres gènes. Un gène *STH* est retrouvé au sein de l'intron 11 de *MAPT* et est transcrit dans le même sens. Ce gène code une protéine nommée Saitohin, dont la fonction n'est pas encore totalement déterminée (Streffler *et al.*, 2003). En plus du gène *STH*, on trouve trois longs ARN non-codants : *MAPT-AS1* (*MAPT Anti Sense RNA 1*) et *RP11-6690E14.4*, transcrits en antisens par rapport *MAPT* et *MAPT-IT1* (*MAPT Intronic Transcript 1*) transcrit dans le même sens que *MAPT* (version GRCh37.p13 du génome humain,

ensembl.org). Le long ARN MAPT-AS1 régule négativement la traduction de l'ARNm de *MAPT* et limite donc la production de protéines tau (Coupland *et al.*, 2016).

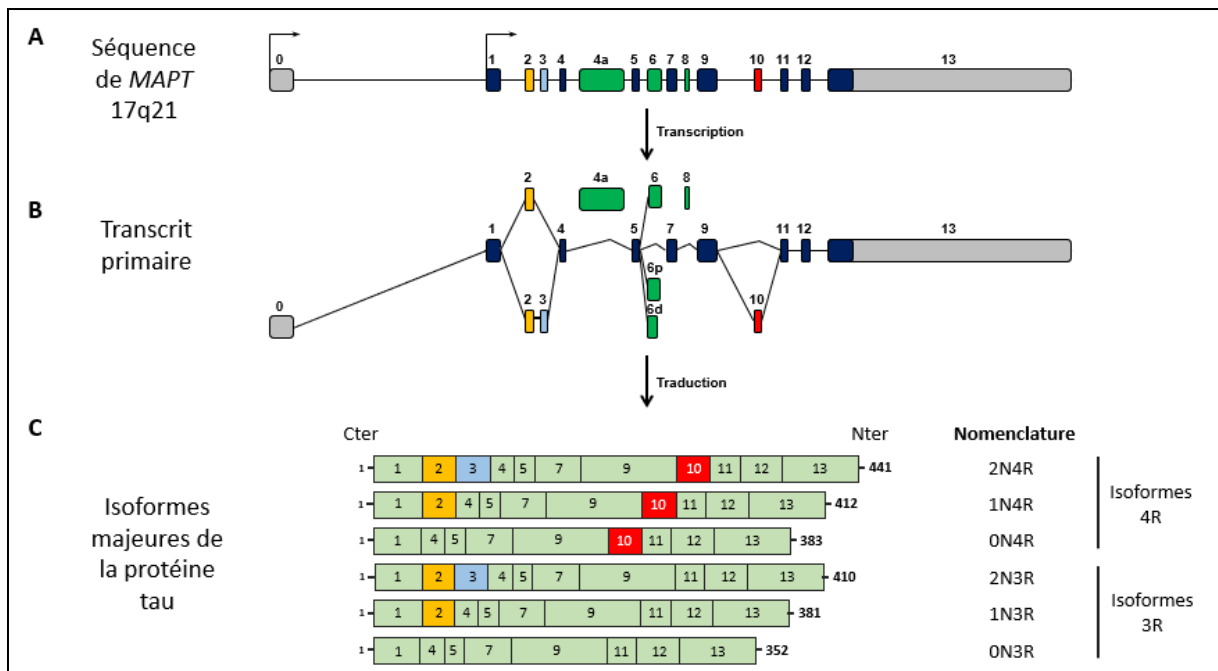
Le gène *MAPT* est conservé au cours de l'évolution. L'homologie entre le gène *MAPT* d'*Homo sapiens* et celui des autres primates varie entre 98 et 100% (Holzer *et al.*, 2004). Chez l'espèce *Mus musculus* (souris), l'homologie entre les orthologues *MAPT* (*H. sapiens*) et *Mapt* (*M. musculus*) est de 88% (Poorkaj *et al.*, 2001). La région du domaine de liaison aux microtubules (MBD, *Microtubule Binding Domain*) est la plus conservée (Sündermann, Fernandez and Morgan, 2016).

## ii. Expression

De manière générale, l'expression de *MAPT* n'est régulée que par un seul promoteur présent dans la région proximale de l'exon E0 (anciennement nommé exon -1). Ce promoteur nommé « *core promoter* » dans la littérature est enrichie en C + G et exempt de boîtes TATA ou CAAT (Andreadis *et al.*, 1996; Sadot *et al.*, 1996). Plusieurs protéines participent à l'activité de ce promoteur comme les facteurs de transcription Sp1, AP2 ou encore Nrf1. La transcription de *MAPT* peut donner 3 transcrits de 2 kb, 6 kb et 9 kb (pour revue (Caillet-Boudin *et al.*, 2015)). La production de ces transcrits diffère en fonction du tissu et du compartiment cellulaire. En effet, le transcrit de 2 kb est ubiquitaire et produit des protéines tau majoritairement nucléaires, le transcrit de 6 kb restreint au système nerveux central (SNC) produit des protéines tau axonales même si cet ARNm a été décrit dans les cellules acineuses pancréatiques (Vanier *et al.*, 1998). Enfin, un transcrit de 9 kb est uniquement exprimé dans le système nerveux périphérique (SNP) et dans la rétine (Goedert, Spillantini and Crowther, 1992; Nunez and Fischer, 1997). Cette spécificité tissulaire a mené Andreadis et ses collaborateurs à émettre l'hypothèse de l'existence d'au moins un autre promoteur pour *MAPT* (Andreadis *et al.*, 1996). Effectivement, les bases de données suggèrent l'existence d'au moins 6 autres promoteurs (Ensembl databases).

Dans le transcrit primaire, les exons 2, 3, 4a, 6, 8 et 10 peuvent subir un épissage alternatif. Chez l'Homme, l'exon 4a est inclus dans le transcrit de 9 kb et est donc retrouvé dans la rétine et dans le SNP. Dans ce dernier, les deux variants protéiques de 758 et 776 acides aminés (AA) sont nommés dans la littérature « *Big tau* » (Goedert, Spillantini and Crowther, 1992). L'exon 8 est compris dans le transcrit final chez certains mammifères, comme le bovin, et semble être absent des tissus humains (Chen, Liu and Yen, 1994). L'exon 6 possède 3 sites d'épissage en 3' et permet donc la production de trois

isoformes différentes de tau nommées 6<sup>+</sup> (exon 6 entier), 6p (cadre de lecture proximal) et 6d (cadre de lecture distal) et pouvant être retrouvées dans le SNC (Luo, Leski and Andreadis, 2004). De manière intéressante, il a été montré que cet exon 6 pouvait également être exprimé dans les cellules acineuses pancréatiques physiologiques et cancéreuses (Vanier *et al.*, 1998). Dans le SNC, les exons 2, 3 et 10 sont concernés par l'épissage alternatif (figure 1B) et donnent six isoformes majeures possibles (figure 1C). Ces isoformes peuvent posséder 0, 1 ou 2 inserts N-terminaux. Ainsi, on nomme 0N, 1N et 2N lorsqu'il y a exclusion des exons 2 et 3, inclusion de l'exon 2 seulement et inclusion des deux exons, respectivement. De la même manière, l'exclusion ou l'inclusion de l'exon 10, codant le deuxième domaine répété de liaison aux microtubules, donne naissance à des isoformes ayant trois ou quatre répétitions. On parle alors d'isoforme 3R et 4R, respectivement (Goedert *et al.*, 1989; Andreadis, 2005). Il est intéressant de noter que l'exon 3 ne peut être inclus dans le transcrit si l'exon 2 ne l'est pas, alors que l'inclusion de l'exon 2 ne suppose pas nécessairement celui de l'exon 3 (Andreadis, Broderick and Kosik, 1995). Dans le SNC, la formation de ces isoformes est régulée suivant un ordre développemental. La plus petite des six isoformes, appelée donc tau 0N3R, est la seule isoforme présente aux stades fœtaux (Couchie and Nunez, 1985; Goedert *et al.*, 1989). Dans les stades adultes, les isoformes 3R et 4R sont présentes en proportions équivalentes (ratio 1:1) avec une sous-représentation des isoformes 2N. En effet, l'exon 3 n'est inclus que dans environ 10% des transcrits finaux (Andreadis, 2005). Enfin, certaines isoformes semblent dépendre de la localisation subcellulaire : les noyaux des neurones d'hippocampe de souris sont en effet enrichis en isoformes 1N (Liu and Götz, 2013).



**Figure 1. Gène, transcrit primaire et isoformes possibles de tau.** Les exons sont représentés par les encadrés colorés et les introns par les lignes. Les exons gris sont les exons ou parties d'exons non codants. Les exons verts sont les exons pouvant être épissés mais non retrouvés dans les transcrits du SNC. Les flèches indiquent les sites attestés ou potentiels d'initiation de la transcription. (A) La séquence de MAPT est composée de 15 exons : l'exon 0 est retrouvé dans la région 5'UTR et est non codant. (B) Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11 et 12 sont constitutifs. L'exon 13 est divisé en deux exons dont le premier est codant et le second dans la région 3'UTR non codant. Les exons 2, 3 et 10 peuvent subir un épissage alternatif et permettent (C) la formation des six isoformes majeures de tau retrouvées dans le SNC. L'isoforme la plus longue est la 2N4R et est composée de 441 AA et l'isoforme la plus petite appelée « isoforme fœtale » 0N3R est composée de 352 AA (pour revue (Caillet-Boudin et al., 2015)).

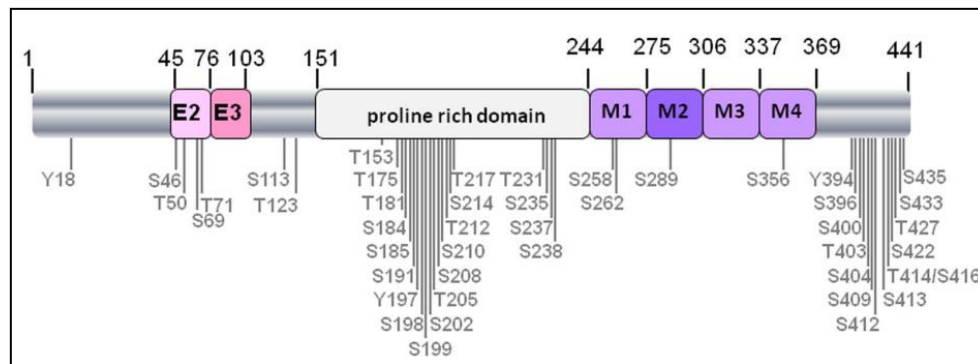
## b. Les protéines tau

### i. Structure primaire

L'isoforme la plus longue de tau présente dans le SNC (2N4R, 441 résidus) est souvent prise comme modèle dans la littérature pour décrire la séquence en AA de tau (Avila *et al.*, 2016; Guo, Noble and Hanger, 2017). La protéine tau peut être décomposée en deux régions principales : la région N-terminale (N-ter) et la région C-terminale (C-ter). Ces deux régions possèdent différents domaines fonctionnels : la séquence N-terminale comprend les 150 premiers AA et est codée par les exons 1 à 5 dont la taille varie selon l'inclusion ou non des exons 2 et 3 (29 AA chacun). La région suivante, codée par l'exon 7 et composée des AA 151 à 243 est une région riche en prolines (PRD, *Proline Rich Domain*). Également



appelée « domaine de projection », elle permet d'établir une séparation correcte entre les microtubules (Chen *et al.*, 1992). Le MBD est codé par les exons 9 à 12 (AA 244 à 369) et se trouve dans la région C-terminale. La présence de la deuxième région répétée R2 (31 AA) dépend de l'inclusion ou non de l'exon 10 lors de l'épissage alternatif et permet la production de l'isoforme 3R (R2-) ou 4R (R2+). Ce domaine MBD est, comme son nom l'indique, impliqué dans la liaison de tau avec la tubuline (Lee, Neve and Kosik, 1989). De cette façon, les isoformes 4R possèdent une affinité pour les microtubules supérieures aux isoformes 3R (Goedert and Jakes, 1990). Enfin, les AA 370 à 441 composent la queue C-terminale (Mandelkow and Mandelkow, 2012; Avila *et al.*, 2016; Guo, Noble and Hanger, 2017).



**Figure 2. Les épitopes phosphorylables de la protéine tau 2N4R.** Les sites de phosphorylation sont majoritairement retrouvés dans la région riche en proline et dans la partie C-terminale de la protéine. Bien que la phosphorylation régule la dynamique des microtubules, un certain nombre de ces épitopes sont anormalement phosphorylés dans la maladie d'Alzheimer (Martin, Latypova, Wilson, Magnaudeix, Perrin, Yardin, et al., 2013) (figure adaptée de (Noble et al., 2013)).

Tout au long de la séquence protéique de tau se trouvent des sérines et thréonines servant de support à différentes modifications post-traductionnelles. Parmi elles, la phosphorylation a été la plus étudiée d'une part pour son implication dans la régulation physiologique de la dynamique microtubulaire mais également pour son altération dans la neurodégénérescence (figure 2) (Noble *et al.*, 2013). D'autres modifications post-traductionnelles peuvent néanmoins être citées : la glycosylation, l'acétylation, glycation, nitration, polyamination, ubiquitinylation ou encore la SUMOylation (pour revue (Martin, Latypova and Terro, 2011)).

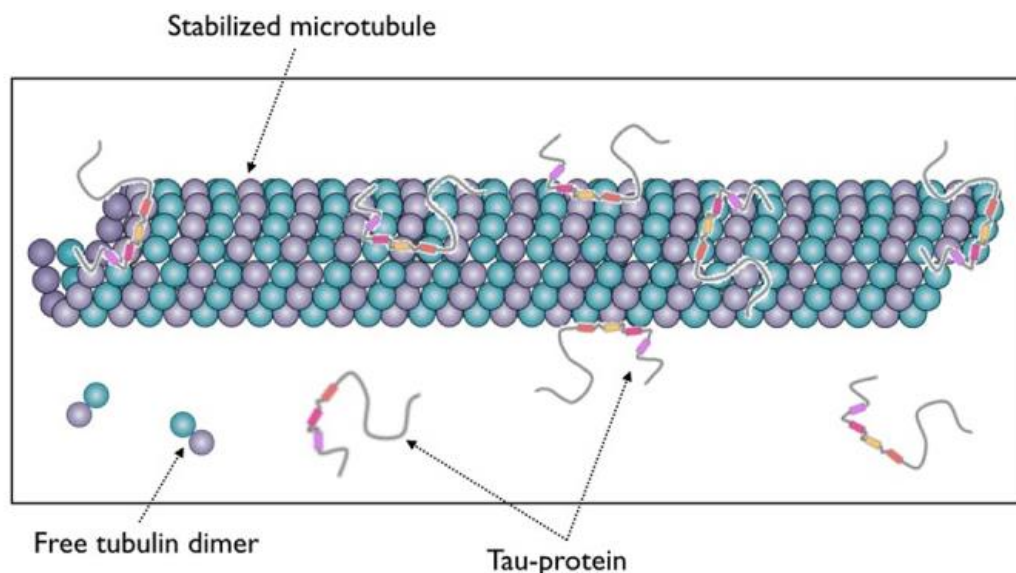
## ii. Autres structures et conformation spatiale

La diversité des protéines provient non seulement de leur séquence en AA, mais également de leur conformation dans l'espace. Ainsi, une protéine peut avoir une structure secondaire, tertiaire voire quaternaire. Il a été considéré pendant un temps que la séquence en AA d'une protéine, en fonction de leur caractère hydrophile ou hydrophobe, détermine sa structure et donc sa fonction (van der Lee *et al.*, 2014). Seulement, certaines protéines possèdent des segments exempts de structure particulière ou sont entièrement désordonnées. C'est le cas notamment de la protéine tau. Dès 1977, Cleveland *et al.*, en tentant de lui caractériser d'éventuelles structures secondaires ou tertiaires, ont montré qu'elle en était dépourvue (Cleveland, Hwo and Kirschner, 1977). D'autres études utilisant des méthodes de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Syme *et al.*, 2002), de dichroïsme circulaire (Schweers *et al.*, 1994) ou encore de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) (Schweers *et al.*, 1994; Mylonas *et al.*, 2008) confirmèrent cette absence de structures secondaires ou tertiaires. La protéine tau est donc désordonnée en solution. Seulement, des études ont montré qu'elle pouvait tout de même afficher des structures particulières, locales, notamment dans sa liaison avec les microtubules (Mukrasch *et al.*, 2009; Kadavath, Hofele, *et al.*, 2015).

## iii. Fonction microtubulaire de la protéine tau

Le cytosquelette d'une cellule est composé de microtubules, de filaments d'actine et filaments intermédiaires. D'un point de vue morphologique, les microtubules forment un tube cylindrique d'un diamètre interne de 25 nm. Ce tube est constitué d'un assemblage de dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  formant des protofilaments (Nogales, Wolf and Downing, 1998). Les microtubules assurent différentes fonctions au sein des cellules. Parmi elles, nous pouvons noter le façonnement de leur morphologie, le contrôle du trafic intracellulaire en régulant le transport de cargos protéiques ou d'organites entre la périphérie et le centrosome ou encore la séparation des chromatides sœurs pendant la transition métaphase-anaphase de la mitose. Les microtubules sont pourvus de plusieurs types protéiques. On retrouve d'une part des protéines motiles telles que la dynéine et la kinésine qui assurent un transport rétrograde (de la périphérie vers le centrosome) et antérograde (du centrosome vers la périphérie), respectivement (Vale *et al.*, 1985; Schnapp and Reese, 1989). On retrouve également un certain nombre de protéines regroupées dans la famille des protéines associées aux microtubules (MAP, *Microtubule-Associated Proteins*). Ces protéines sont connues pour des fonctions polymérisatrices des dimères de tubuline entre

eux. Lors de ses travaux, l'équipe de Marc. W Kirschner décrit tau comme un facteur polymérisateur des microtubules. En effet, la seule présence de tau, *in vitro*, est suffisante pour assembler des monomères de tubuline en un microtubule (Weingarten *et al.*, 1975). Depuis, beaucoup de travaux ont été réalisés *in cellulo* et *in vivo* et prouvent le rôle essentiel que joue tau dans l'assemblage et la structuration des microtubules (figure 3) (Drubin and Kirschner, 1986; Kanai *et al.*, 1989; Lee and Rook, 1992). Néanmoins, la nature de la liaison de tau avec le microtubule n'est pas totalement élucidée. Kar et collègues ont montré que tau stabilisait les microtubules en liant la face interne du tubule (Kar *et al.*, 2003). Dans une autre équipe, cette liaison a été expliquée par un lien formé à l'interface entre tau et les hétérodimères de tubuline (Kadavath, Hofele, *et al.*, 2015). D'autres ont montré que tau se fixait à la fois à travers et tout au long des protofilaments (Santarella *et al.*, 2004). Martinho et ses collaborateurs quant à eux ont caractérisé la présence d'un pont disulfure entre le mur microtubulaire et tau (Martinho *et al.*, 2018). La formation de la liaison tau-tubuline suppose également une conformation particulière. En effet, bien que tau ne possède pas de structure particulière en solution, sa liaison avec la tubuline suppose une conformation en épingle à cheveux impliquant deux hexapeptides au début des séquences répétées R2 et R3 du MBD (VQIINK & VQIVYK) (Mukrasch *et al.*, 2009; Kadavath, Jaremko, *et al.*, 2015).



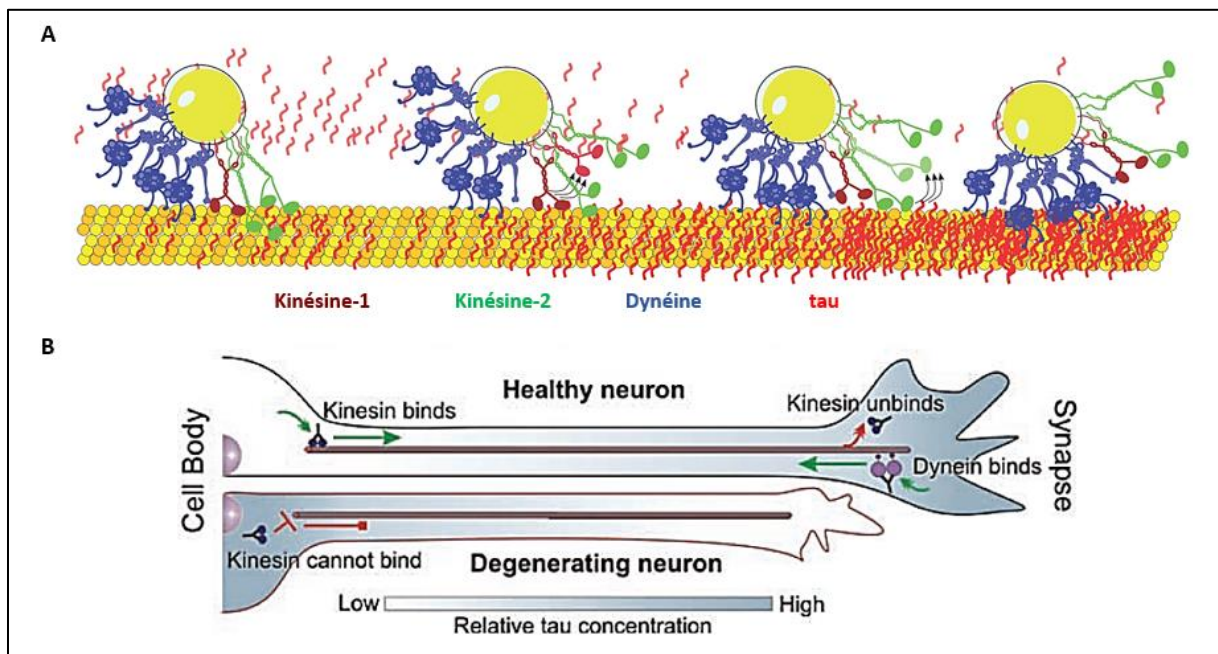
**Figure 3. Représentation de l'interaction entre la protéine tau et le microtubule stabilisé.** La protéine régule la dynamique des microtubules. Lorsqu'elle s'y fixe elle les stabilise ; lorsqu'elle s'en détache leur dynamique

est augmentée. La protéine tau peut lier la face externe et la face interne des microtubules (pour revue (Hervy and Bicout, 2019)).

La dynamique microtubulaire régulée par la protéine tau dépend de sa fixation sur le microtubule. En effet, lorsqu'elle se trouve fixée, le cycle dépolymérisation/polymérisation est ralenti et les microtubules sont stabilisés. À l'inverse, lorsqu'elle s'en détache, ce cycle est accéléré et les microtubules sont plus dynamiques (Weingarten *et al.*, 1975; Drubin and Kirschner, 1986; Lee and Rook, 1992). La fixation ou non de tau aux microtubules dépend de son état de phosphorylation. Un grand nombre d'épitopes de tau pouvant être soumis à la phosphorylation sont situés dans les régions PRD et MBD (figure 2). Ainsi, la phosphorylation de ces différents sites entraîne un détachement de tau des microtubules alors que leur déphosphorylation permet à nouveau la fixation (Noble *et al.*, 2013). Ces cycles de phosphorylation/déphosphorylation sont strictement régulés par des kinases et phosphatases. Parmi les kinases se trouvent trois familles : les protéines kinases dirigées contre les prolines (PDPK, *Proline-Directed Protein Kinases*) telles que la GSK3 $\beta$  et CDK5, les protéines kinases non-dirigées contre les prolines (non-PDPK) telles que Akt, la protéine kinase C ou encore la CaMKII (*Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependant protein kinase II*) et enfin les protéines kinases à tyrosine (TPK, *Tyrosine Protein Kinases*) (pour revue (Martin, Latypova, Wilson, Magnaudeix, Perrin, Yardin, *et al.*, 2013)). Les phosphatases de tau sont, elles, réparties dans deux familles : les phospho-protéines phosphatases (PPP, *PhosphoProtein Phosphatase*) comprenant PP2A, la phosphatase la plus étudiée de tau et la famille de protéines phosphatases à tyrosine (PTP, *Protein Tyrosine Phosphatase*) (pour revue (Martin, Latypova, Wilson, Magnaudeix, Perrin and Terro, 2013)). En conclusion, la phosphorylation de tau constitue une modification post-traductionnelle essentielle dans la régulation de la dynamique microtubulaire.

Dans l'axone du neurone, il existe un gradient de concentration croissant en tau partant du cône de l'axone et allant jusqu'à la synapse (figure 4B). Cette différence de localisation de tau joue un rôle primordial dans la physiologie neuronale. En effet, au-delà de sa stricte interaction avec la tubuline, tau interagit également avec les protéines motiles des microtubules : la kinésine et la dynéine. Dans l'axone, le transport de cargo de la région proximale vers la région distale et inversement est élémentaire pour le fonctionnement correct des influx nerveux. Aussi, il a été montré que tau favorise la liaison de la dynéine à la tubuline et à l'inverse empêche la fixation de la kinésine (figure 4A). Ainsi, tau, au niveau synaptique

est favorable au transport rétrograde et sa faible concentration à la base de l'axone est plutôt favorable au transport antérograde (Dixit *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2018).



**Figure 4. La protéine tau inhibe la kinésine de type 1, augmente la liaison dynéine-microtubule et favorise le transport rétrograde.** A) Les microtubules sont représentés en jaune/orange et les protéines tau en rouge. Les familles de protéines motiles des microtubules sont représentés en rouge foncé pour la kinésine-1, vert pour la kinésine-2 et bleu pour la dynéine (Chaudhary *et al.*, 2018). B) Dans le neurone sain, la forte concentration de tau dans l'axone distal empêche la liaison kinésine-microtubule et favorise la liaison dynéine-microtubule. Dans le neurone en dégénérescence, le gradient de concentration est inversé et perturbe le transport de cargo microtubulaire (Dixit *et al.*, 2008).

Le fonctionnement correct du neurone implique une dynamique microtubulaire et un trafic intracellulaire strictement régulés. Dans certains contextes neurodégénératifs, la synapse s'appauvrit en protéines tau qui s'accumulent dans le corps cellulaire provoquant une inversion du gradient de concentration et une altération du transport de cargo, participant à la mort neuronale (figure 4B) (Dixit *et al.*, 2008). Cet évènement survient en partie lorsque la protéine tau adopte une conformation anormale qui empêche sa fixation sur la tubuline dans un groupe de pathologies appelées tauopathies.

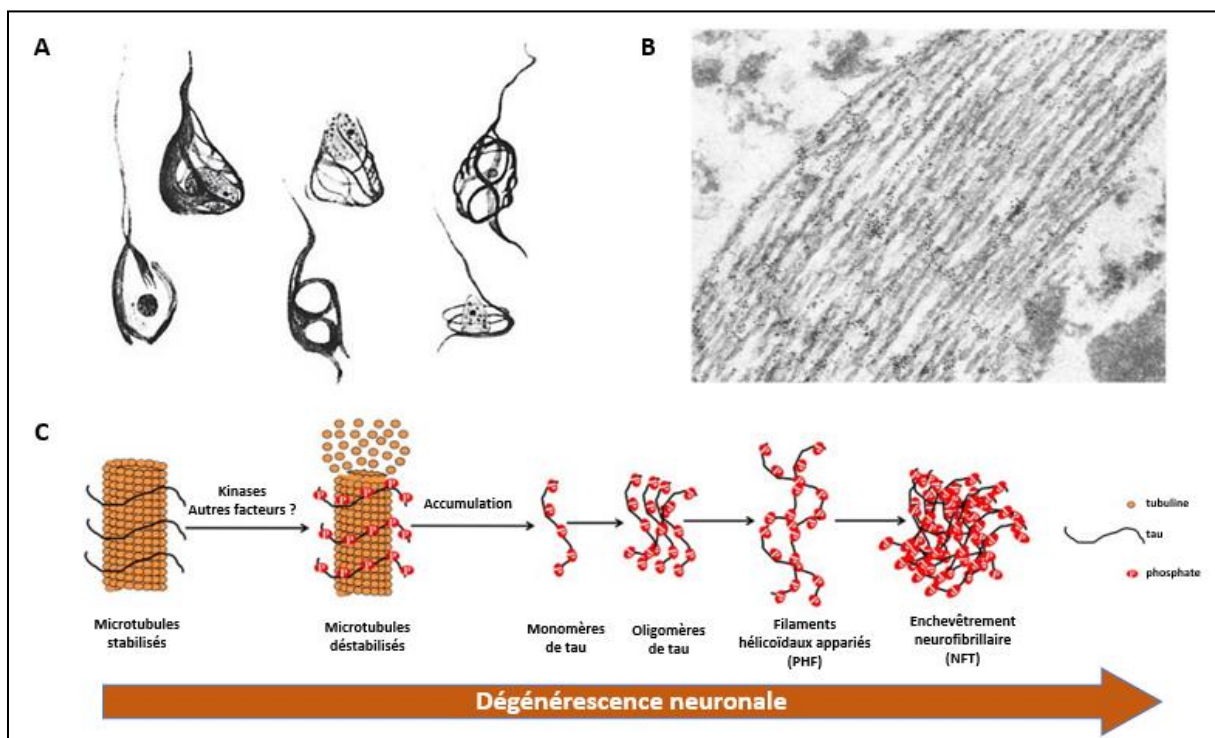
## 2. Implication de la protéine tau dans deux pathologies

## a. Les maladies neurodégénératives

### i. Alzheimer et tauopathies

En 1901, le neuropsychiatre allemand Aloïs Alzheimer examine une femme de 51 ans, Auguste Deter, présentant des troubles mnésiques, de la parole et autres symptômes psychologiques. L'autopsie de son cerveau a révélé deux lésions particulières, une située dans le domaine extracellulaire appelée « plaques séniles » composée d'agrégat de peptides  $\beta$ -amyloïde et une autre au sein du neurone appelée « enchevêtrement neurofibrillaire » (NFT, *Neurofibrillary tangles*). Il présente alors sa découverte en 1906 à l'occasion de la 37<sup>ème</sup> conférence des psychiatres allemands du Sud-Ouest. Quatre années plus tard, il est proposé que cette pathologie porte le nom de son découvreur : la maladie d'Alzheimer (MA) (Cipriani *et al.*, 2011). Il existe d'autres pathologies présentant les mêmes lésions intracellulaires. C'est le cas notamment de la paralysie supranucléaire progressive (PSP, *Progressive supranuclear palsy*), la maladie de Pick (PD, *Pick disease*), la démence corticobasale (CBD, *Corticobasal Dementia*) ou encore la démence frontotemporale liée au chromosome 17 (FTDP-17, *Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*). En tout, on dénombre près d'une vingtaine de maladies similaires (Lebouvier, Pasquier and Buée, 2017). Il fallut attendre 1985 et les travaux de Brion et al pour identifier la protéine tau comme constituant principal de ces enchevêtrements (figure 5A) (Brion *et al.*, 1985). Ces pathologies portent alors le nom de tauopathies, la MA étant la plus fréquente d'entre elles. Les mécanismes impliquant la protéine tau et menant à la dégénérescence neuronale sont bien décrits. Les protéines tau subissent une hyperphosphorylation sur certains de leurs épitopes ce qui entraîne une perte considérable d'affinité pour les microtubules. Celles-ci s'en détachent, acquièrent une conformation en feuillet  $\beta$  au niveau des deux séquences VQIINK et VQIVYK qui participent au processus d'auto-agrégation des protéines tau entre elles. En effet, les protéines tau hyperphosphorylées forment progressivement des oligomères solubles de tau puis adoptent une structure fibrillaire observable par microscopie électronique (figure 5B) appelées filaments hélicoïdaux appariés (PHF, *Paired Helical Filaments*). Les PHF s'assemblent finalement pour former les NFT (figure 5C) (Brion *et al.*, 1985; Goedert *et al.*, 1988; von Bergen *et al.*, 2000; Mukrasch *et al.*, 2009). Bien que les principales kinases et phosphatases de tau soient décrites, les événements menant à cette agrégation restent peu connus. En plus de l'hyperphosphorylation de certains épitopes de tau, plusieurs mutations rapportées dans la FTDP-17 notamment participent à la dégénérescence neurofibrillaire. Ainsi, les mutations P301L, V337M et R406W diminuent l'affinité de tau avec les microtubules ( $K_d$  0.079  $\mu$ M ; 0.048  $\mu$ M ;

0.089  $\mu\text{M}$  respectivement contre un  $K_d$  de 0.039  $\mu\text{M}$  pour les WT) rallongeant ainsi le temps nécessaire à l'assemblage du microtubule. Cette dissociation plus importante entre tau et la tubuline favorise la déstabilisation des microtubules et promeut l'agrégation des protéines tau (Hong *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a été montré que la protéine tau peut être exempte des dix premiers AA de sa région N-terminale. Des études ont montré que cette troncation de la protéine tau pouvait être due à une protéolyse partielle due à l'activité de caspases et calpaïnes (Derisbourg *et al.*, 2015) ou de l'activité d'un promoteur alternatif de *MAPT* (Huin *et al.*, 2017). Des hypothèses naissantes suggèrent une initiation de la traduction au niveau de codons alternatifs comme retrouvé dans certaines maladies neurodégénératives. Bergen et al ont montré que les séquences peptidiques VQIINK et VQIVYK, également appelées PHF6\* et PHF6, respectivement, étaient pro-agrégatives (von Bergen *et al.*, 2000). Il est suggéré que la troncation de tau en amont de ces séquences permet de les démasquer et mène à son agrégation. Ces formes tronquées sont en effet retrouvées chez les patients atteints de plusieurs tauopathies telles que la MA, la PSP ou encore la CBD et font partie intégrante des PHF (Novák, 1994; Mena *et al.*, 1996; Wray *et al.*, 2008).



**Figure 5. Mécanismes d'agrégation de protéines tau et neurodégénérescence.** A) Dessins précurseurs d'Aloïs Alzheimer de fibres retrouvés dans les neurones d'Auguste Deter (Jellinger, 2006). B) Observation par microscopie électronique de filaments hélicoïdaux appariés de protéines tau (Brion et al., 1985) et C) Modèle de

détachement du microtubule et d'agrégation de la protéine tau dans la neurodégénérescence (modifié de (Mamun et al., 2020)).

En raison de l'importance de la protéine tau dans l'étiologie des tauopathies, des modèles animaux et cellulaires déficients en tau ou possédant ses formes pathologiques ont été développés. De manière intéressante, ces modèles, en plus de la neurodégénérescence caractéristique, possèdent également plusieurs altérations cellulaires et tissulaires notoires (Degiorgis *et al.*, 2020). On retrouve par exemple une résistance à l'insuline (Marciniak *et al.*, 2017), des altérations dans certaines voies de signalisation (Perea, Ávila and Bolós, 2018), l'apparition de stress cellulaires (Violet *et al.*, 2014, 2015) ou encore une accumulation de dommages à l'ADN (Sultan *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2020). Ces perturbations corroborent les observations cliniques qui montrent que des patients atteints de certaines tauopathies affichent également d'autres troubles comme des désordres métaboliques (Watts *et al.*, 2013). Ces études supposent donc une pléiotropie pour tau. De plus, Gunawardana et collègues ont mis en lumière une interactome conséquent de tau (Gunawardana *et al.*, 2015a). Cette étude montre que tau interagit avec plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme des ARN ainsi qu'avec les sous-unités 60S et 40S du ribosome. Sa grande diversité de partenaires protéiques renforce alors l'hypothèse de l'implication de la protéine tau dans plusieurs mécanismes cellulaires. Par exemple, Chauderlier et al ont démontré que tau interagissait avec la protéine DDX6, impliquée dans le métabolisme des ARNm et pouvant intervenir, donc, dans le métabolisme des acides nucléiques (Chauderlier *et al.*, 2018). De plus, l'étude de Gunawardana a permis de trouver une interaction du domaine N-terminal de tau avec les histones suggérant un rôle de tau au niveau de la chromatine. D'autres ont mis en évidence une interaction de tau avec la phosphatase PTEN (en anglais, « *Phosphatase and TENSine homologue on chromosome 10* ») (Marciniak *et al.*, 2017; Tai *et al.*, 2020) qui intervient dans la voie PI3k/Akt ou encore la dynéine (Dixit *et al.*, 2008), pour le transport microtubulaire. De manière intéressante, l'étude de Gunawardana montre que la mutation P301L de tau affecte son interaction avec des partenaires liant sa partie C-terminale prouvant ainsi que cette perte de fonction de tau altère fortement ses fonctions (Gunawardana *et al.*, 2015b).

## ii. Fonctions non-microtubulaires de la protéine tau

### 1. Modulation de la voie de l'insuline



Dans leur travaux, Marciniak et al étudièrent le rôle de la délétion de tau sur le métabolisme glucidique. Il est admis en effet que des maladies neuronales telles que la MA sont associées à des désordres métaboliques comme le diabète de type II et l'obésité (Watts *et al.*, 2013; Kandimalla, Thirumala and Reddy, 2017). Une résistance à l'insuline est en effet retrouvée chez les patients atteints de ce type de pathologies neurodégénératives. Dans un modèle murin KO-tau, les auteurs de l'étude se sont intéressés à l'activation de la voie de l'insuline. Dans l'hippocampe de ces souris, la délétion de tau entraîne une diminution significative de la phosphorylation activatrice du récepteur à l'insuline, du pourcentage de phosphorylation de la protéine Akt et de l'augmentation des différents facteurs symptomatiques d'un désordre métabolique. La transfection de cellules de neuroblastome murin N1E-115 avec un plasmide codant la séquence 1N4R de la tau humaine a permis de montrer que tau diminue la déphosphorylation de la phosphatidylinositol-3-phosphate par une interaction inhibitrice de la phosphatase PTEN (Marciniak *et al.*, 2017). Cette étude a donc démontré que la protéine tau, à travers la suractivation de la voie PI3K/Akt, joue un rôle primordial dans le métabolisme et la signalisation de l'insuline dans le cerveau.

## 2. Neurogenèse et fonction neuritique

Peu de temps après sa découverte dans le SNC et son rôle dans la stabilisation des microtubules, Drubin et al ont montré que, pendant l'embryogenèse, la protéine tau initie la formation des neurites et contribue à leur croissance. Ce mécanisme implique la signalisation du facteur de croissance neuronal (NGF, *Nerve Growth Factor*) et une polymérisation accrue des microtubules vers la membrane plasmique (Drubin *et al.*, 1985). Cette observation a été retrouvée par des expériences utilisant des oligonucléotides antisens de l'ARNm de *MAPT* dans des cultures primaires de neurones de rats (Caceres and Kosik, 1990). De manière intéressante, cette excroissance membranaire qui représente les neurites dans les neurones a également été retrouvée dans les cellules de tissu reproducteur d'insecte Sf9 montrant que cet effet de tau est valable pour des cellules neuronales et non neuronales (Knops *et al.*, 1991).

## 3. Protéine tau et acides nucléiques

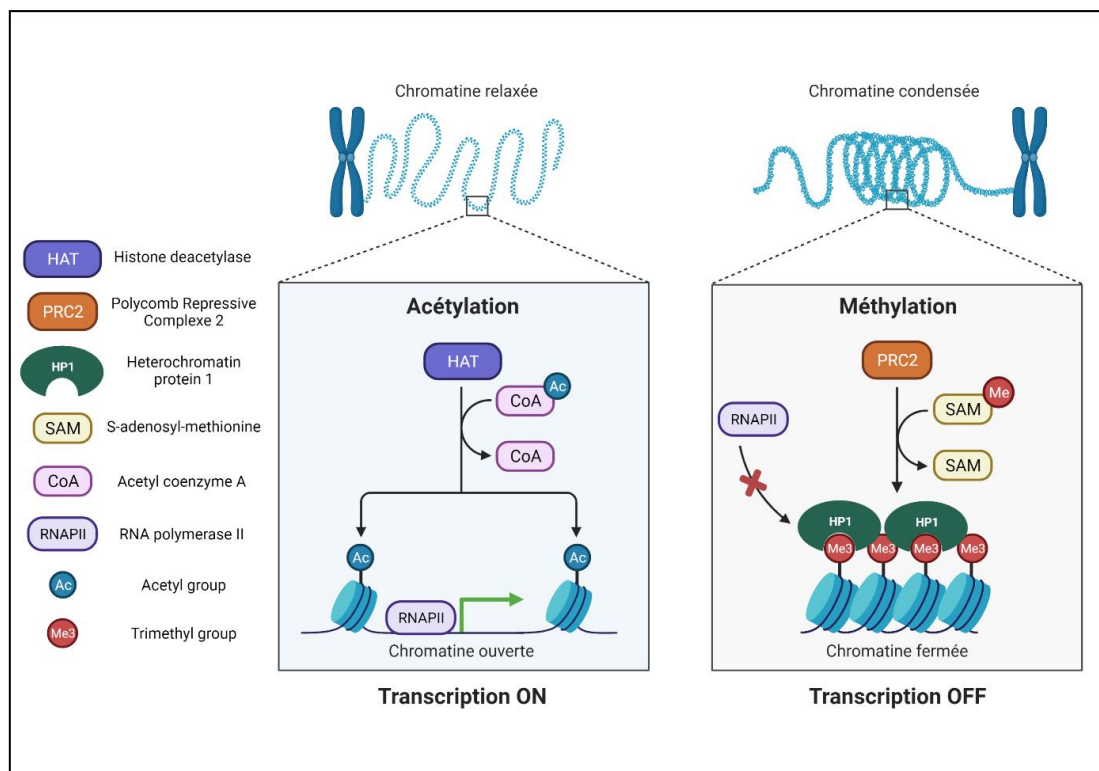
Seulement deux années après la découverte de tau par Weingarten et ses collaborateurs en 1975 (Weingarten *et al.*, 1975), Corces et al déterminèrent que les MAPs avaient la capacité de lier l'ADN *in vitro* (Corces *et al.*, 1980a). Dans une autre étude, ils identifèrent la protéine tau parmi ces MAPs (Villasante *et al.*, 1981). Ces observations furent particulièrement intéressantes lorsqu'on les replace dans un contexte où Loomis et collègues identifèrent tau dans le compartiment nucléaire (Loomis *et al.*, 1990). Depuis, plusieurs travaux se sont focalisés sur le rôle nucléaire de tau et les liens qu'elle entretient avec les acides nucléiques (pour revue (Galas *et al.*, 2019)). Le modèle actuel dans la littérature suggère que tau interagit directement avec la molécule d'ADN, précisément au niveau de son petit sillon, et, à travers cette interaction, induirait une conformation résistante à l'endommagement. Ce modèle suppose alors qu'une cellule possédant tau subirait dès le départ moins de dommage que son homologue dépourvue de tau. Hua et ses collaborateurs ont notamment montré *in vitro* que la protéine tau était associée à l'ADN double brin et que cette interaction permettait de protéger l'acide nucléique de la dénaturation hyperthermique (Hua *et al.*, 2003). Une telle interaction a également été suggérée par l'étude de Wei et al qui expliquent que le complexe tau-protéine serait protecteur contre la peroxydation (Wei *et al.*, 2008a). Plus tard, Lu et al confirmèrent cette hypothèse et montrèrent que la protection que tau pourrait apporter en s'associant à l'ADN était valable pour une protéine tau principalement déphosphorylée (Lu *et al.*, 2013). Toutefois, la plupart des études citées précédemment ont été conduites en dehors d'un environnement cellulaire et pour la plupart en utilisant des protéines tau recombinantes. Dans ce contexte, les preuves *in cellulo* ou *in vivo* d'une interaction directe entre tau et l'ADN ainsi que le rôle de cette interaction ne sont pas totalement élucidées. En effet, aucune séquence spécifique de l'ADN n'a été identifiée pour interagir avec tau. Toutefois, elle est retrouvée dans des régions précises du génome.

#### 4. Chromatine et protéine tau

Les modifications de l'état de la chromatine, compactée pour l'hétérochromatine ou relaxée pour l'euchromatine, jouent un rôle primordial dans l'expression génique. Brièvement, dans une structure appelée « collier en perles », l'ADN s'enroule autour d'un octamère de protéines histones sur une longueur de 148 pb. Cette structure appelée nucléosome est composée d'un doublet de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Ces histones ont deux particularités essentielles : leur séquence N-terminale se trouve en dehors du nucléosome ce qui la rend accessible à plusieurs types d'enzymes et

cette queue N-terminale possède beaucoup de sites pouvant subir différentes modifications post-traductionnelles. Par exemple, certaines méthylations modulées par les histones méthyltransférases (HMT) peuvent, dans certains cas, promouvoir le rapprochement des nucléosomes les uns des autres permettant le recrutement de facteurs qui favorisent la formation d'hétérochromatine. À l'inverse, d'autres modifications comme l'acétylation favorisent l'ouverture de la chromatine. Ces modifications post-traductionnelles d'histones contrôlent l'expression génique et sont modulées par plusieurs protéines (figure 6).

Des aberrations chromosomiques sont retrouvées dans plusieurs tauopathies (Moorhead and Heyman, 1983; Rossi *et al.*, 2018). Leur nature peut être la formation de mutations ponctuelles, l'apparition d'aneuploïdies et déstructuration de l'organisation de la chromatine qui mènent à l'expression de gènes initialement non transcrits et une réentrée du neurone post-mitotique dans le cycle cellulaire (Rossi *et al.*, 2013; Frost, Hemberg, Lewis and Mel B. Feany, 2014). En revanche, la cause de ces altérations géniques n'est pas entièrement élucidée. Par conséquent, plusieurs études se sont focalisées sur le rôle de la protéine tau dans l'organisation de la chromatine.



**Figure 6. Synthèse des mécanismes moléculaires formant l'euchromatine ou l'hétérochromatine.**

Représentation simplifiée des modifications post-traductionnelles des histones dans les nucléosomes. Ces modifications comme l'acétylation ou la méthylation modifient leur distance les uns des autres et permet

formation d'euchromatine associée à l'expression génique ou à la formation hétérochromatine permettant la répression génique. D'autres mécanismes moléculaires sont impliqués dans ce processus (Created with BioRender.com).

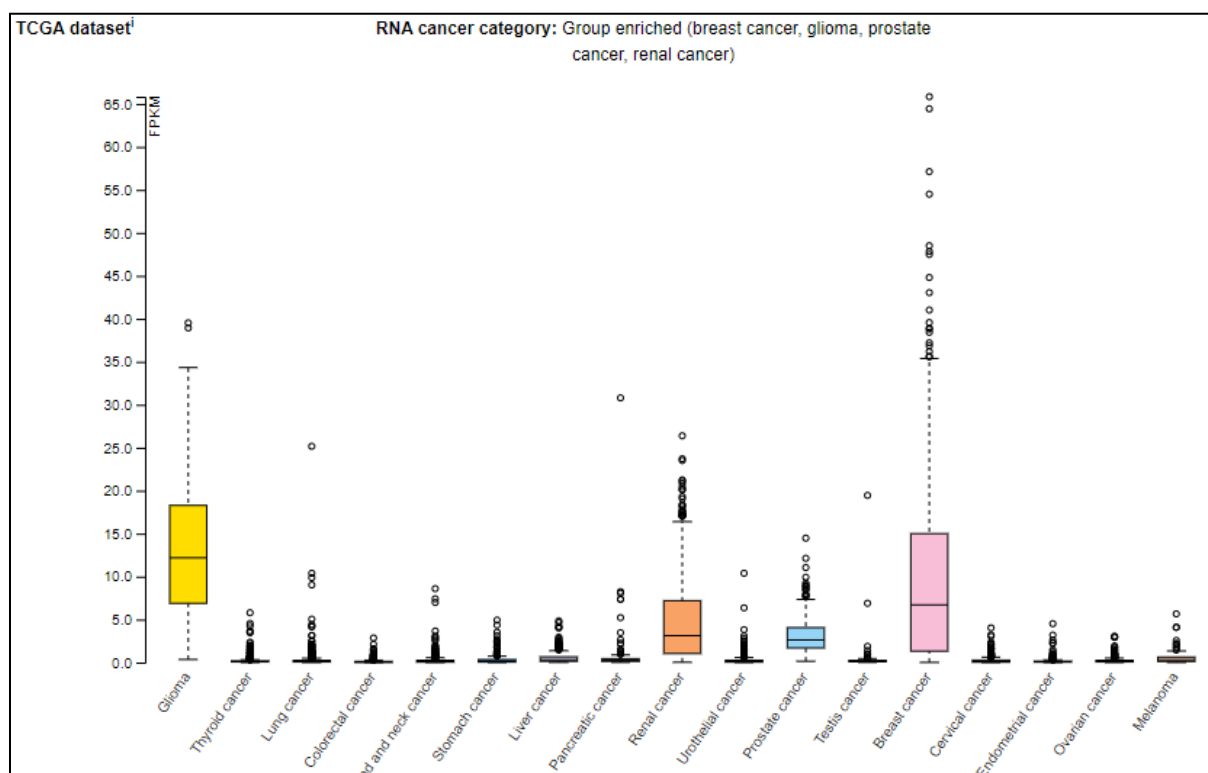
Les premières évidences qui ont démontré une association entre tau et la chromatine sont apportées en 1995 par l'étude de Greenwood et Johnson. En isolant les noyaux de la lignée de neuroblastome humain LA-N-5, les auteurs ont confirmé les travaux de l'équipe de Binder (Loomis *et al.*, 1990). Non seulement tau était présente dans le noyau mais était également extraite biochimiquement dans les fractions chromatiniennes (Greenwood and Johnson, 1995), ce qui a été confirmé par d'autres études qui ont montré que tau était physiquement associée à certaines régions d'hétérochromatine et leur assurait une stabilité (Frost, Hemberg, Lewis and Mel B Feany, 2014; Mansuroglu *et al.*, 2016a). Plus tard, en utilisant un modèle murin portant la mutation humaine de tau P301L et un modèle de Drosophile portant la mutation tau<sup>R406W</sup> retrouvées dans la FTDP-17, Frost et collègues ont montré que la perte de fonction physiologique de tau était accompagnée d'une perte des marques H3K9me3 et de la protéine HP1 $\alpha$ , deux constituants caractéristiques de l'hétérochromatine et donc d'une relaxation de la chromatine ainsi qu'une réexpression de gènes initialement réprimés (Frost, Hemberg, Lewis and Mel B. Feany, 2014). Ces travaux ont permis d'attribuer à tau un rôle dans le maintien de l'hétérochromatine aussi bien dans des cellules neuronales que non-neuronales. De manière intéressante, l'étude de Frost suggère que la déstructuration de la chromatine pourrait être induite par des dommages oxydatifs induits par un stress oxydant (Frost, Hemberg, Lewis and Mel B. Feany, 2014), facteur important dans l'étiologie des maladies neurodégénératives et dans les cancers et qui sera décrit plus loin, dans le chapitre 2.

Bien que les fonctions décrites précédemment aient été intégrées dans un contexte neuronal, il n'est pas à exclure qu'elles soient également valables dans d'autres types cellulaires. En effet, la régulation de la dynamique des microtubules abondamment décrite dans les axones des neurones a déjà été retrouvée dans d'autres tissus non-neuronaux (Lee and Rook, 1992). Aussi, l'expression de *MAPT* a été retrouvée dans plusieurs tissus périphériques sains et pathologiques. L'exercice de ces fonctions dans des cellules cancéreuses pourrait s'avérer être un facteur de progression des tumeurs et tau, une protéine impliquée dans l'agressivité tumorale.

## b. Les cancers

Le cancer est une maladie qui se définit par une croissance anarchique et incontrôlée de cellules dites anormales. La cellule cancéreuse, à l'inverse de la cellule non-cancéreuse, présente plusieurs caractéristiques. Hanahan et Weinberg en proposent au moins six : en dérégulant leur production en facteurs de croissance ou en activant constitutivement des voies de signalisation telles que celles des PI3k/Akt et des MAPK, les cellules cancéreuses maintiennent leurs signaux de prolifération. Ceci est en partie dû à des mutations gains-de-fonctions de proto-oncogènes tels que *AKT* (figure 10) ou *BRAF* (figure 11). Ces dérégulations sont également accompagnées de mutations perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs, comme *PTEN* ou encore *TP53*, qui ont pour fonction physiologique un arrêt de la croissance ou la mort cellulaire. Des mutations de *TP53* sont en effet retrouvées dans plusieurs types tumoraux et sont responsables d'une résistance à l'apoptose. De manière intéressante, la nécrose est également une caractéristique de la masse tumorale et permet le recrutement de facteurs pro-inflammatoires tels que l'interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) stimulant la prolifération. Les altérations de ces deux mécanismes de mort cellulaire participent donc à la croissance tumorale. Un autre mécanisme inhérent aux cellules cancéreuses est l'inactivation de la sénescence qui consiste en un arrêt irréversible de la prolifération. Dans environ 90% des cancers, la télomérase, une ADN polymérase permettant la réplication des télomères est réactivée et permet d'échapper à la sénescence et d'acquérir une immortalité proliférative. Des mutations et des réarrangements chromosomiques du gène *TERT* ont été décrits comme responsable de cette réactivation. Enfin, les cellules cancéreuses ont la capacité de développer leur propre système vasculaire avec l'augmentation d'expression de certains gènes tels que le *VEGF* ainsi qu'une migration et la formation de métastases pouvant apparaître par l'inactivation ou la mutation de gènes comme celui codant la protéine de jonction E-cadhérine (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces caractéristiques augmentant le taux de prolifération et une résistance à l'apoptose sont principalement acquises par une instabilité génomique importante permettant des expressions géniques aberrantes.

L'expression du gène *MAPT* a été relatée dans certains cancers (figure 7). Bien que ses principales fonctions aient été principalement étudiées dans les neurones, elles peuvent présenter un avantage sélectif à la cellule cancéreuse. Celles-ci seront décrites dans la partie « *Les fonctions établies ou potentielles des protéines tau dans les cancers*, I.2.b.ii ». En revanche, les mécanismes menant à l'expression de *MAPT* dans les cancers ne sont pas clairement définis. Plusieurs hypothèses peuvent l'expliquer.



**Figure 7. Expression de MAPT dans les cancers.** L'ARNm de MAPT est retrouvé majoritairement dans les gliomes, le cancer rénal, de la prostate et du cancer. Ces données sont recueillies à partir de la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas). Des études ont rapporté une expression de MAPT au niveau de son ARNm et de ses protéines dans d'autres types de tumeurs (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186868-MAPT/pathology>).

### i. Mécanismes de surexpression de MAPT

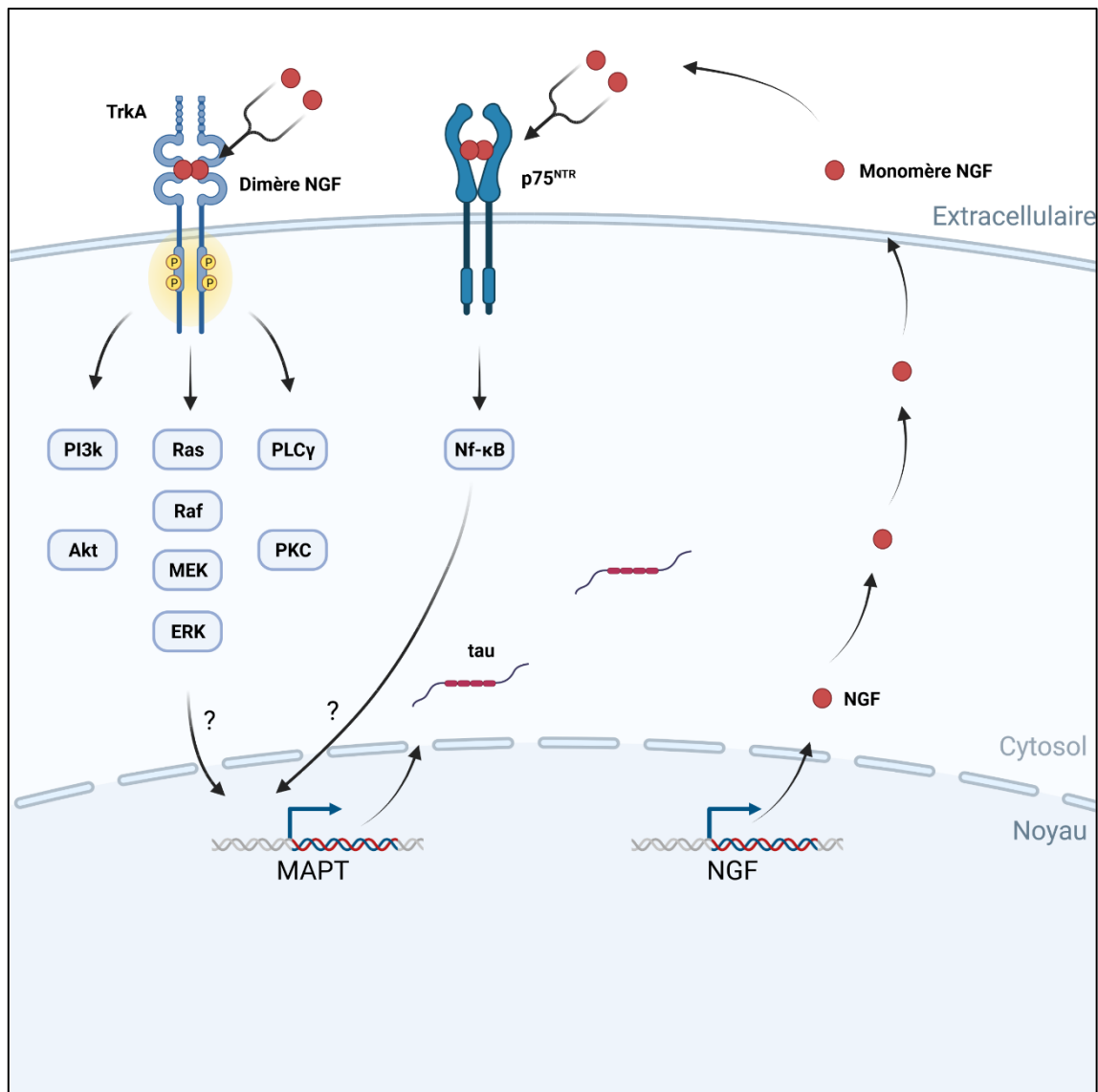
#### 1. La stimulation oestrogénique

Certaines cellules cancéreuses utilisent des facteurs externes pour croître. Par exemple, certaines d'entre elles utilisent des voies de signalisation initiées par des hormones. On parle dans ce cas de cancers hormono-dépendants, leur croissance nécessitant des stimuli hormonaux. Parmi eux, nous pouvons noter certains cancers du sein, de l'ovaire ou de la prostate. Cette dépendance aux hormones a permis le développement de thérapies hormonales afin de ralentir la croissance tumorale (pour revue (Tremont, Lu and Cole, 2017)).

En 1991, les travaux de Ferreira et Caceres ont démontré qu'une stimulation à un œstrogène, l'œstradiol  $17\beta$ , de culture primaire de neurones hypothalamiques entraînait une augmentation de la croissance neuritique (dendrites + axones). De manière intéressante, cette croissance a été expliquée par une augmentation de l'expression de tau dans ces neurones. En effet, tau est requis pour la croissance neuritique (Liu, Lee and Jay, 1999). Ainsi, les auteurs conclurent que l'œstradiol  $17\beta$  stimulait l'expression de tau qui permettait la croissance neuritique (Ferreira and Caceres, 1991). Cette étude a été la première à établir un lien de causalité entre des stimuli œstrogéniques et l'expression de tau. Plus tard, des études ont confirmé cette corrélation dans certains cancers. Dans le cancer du sein notamment, il a été confirmé que l'œstradiol augmentait l'expression de tau et que cette augmentation était associée à une plus grande résistance aux taxanes (Andre *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2010a). D'autres ont suggéré qu'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) était présent en amont du promoteur de *MAPT* et permettait sa régulation (Pentheroudakis *et al.*, 2009; Ikeda *et al.*, 2010a). Même s'il semble que la majorité des tumeurs surexprimant tau soit des tumeurs d'organes impliqués dans la reproduction et donc fortement dépendants des hormones, l'hypothèse selon laquelle les œstrogènes seraient seules et uniques responsables de l'expression de tau dans les cellules cancéreuses n'explique pas pourquoi tau est également exprimée dans des cancers hormono-indépendants (Spicakova *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Gargini *et al.*, 2020). Il est donc fort probable que la surexpression de tau dans les cancers soit multifactorielle.

## 2. La stimulation par le NGF

Outre les hormones, les facteurs de croissance constituent les effecteurs extracellulaires les plus impliqués dans les fonctions cellulaires. Dans un contexte tumoral, les facteurs de croissance tels que l'EGF, l'IGF, le VEGF ou encore le NGF interviennent dans les différents stades de la progression tumorale (Witsch, Sela and Yarden, 2010). À travers une boucle autocrine, il a été montré dans plusieurs lignées tumorales mammaire que le NGF stimule la prolifération cellulaire par l'intermédiaire du récepteur membranaire  $p75^{\text{NTR}}$  et la voie de signalisation Nf- $\kappa$ B ainsi qu'un effet anti-apoptotique via le récepteur  $p140^{\text{TrkA}}$  et la voie de signalisation MAP-kinase (Descamps *et al.*, 2001a; Dollé *et al.*, 2003).



**Figure 8. Implication du NGF dans l'expression de MAPT.** Pendant la neurogenèse, le NGF stimule l'activité du promoteur de MAPT et conduit à son expression. Dans les neurones, ce processus conduit à la formation des neurites. Certaines cellules cancéreuses mammaires utilisent le NGF à travers une boucle autocrine pour proliférer. L'expression de MAPT dans ce type tumoral pourrait alors être initiée par cette signalisation autocrine (Created with BioRender.com).

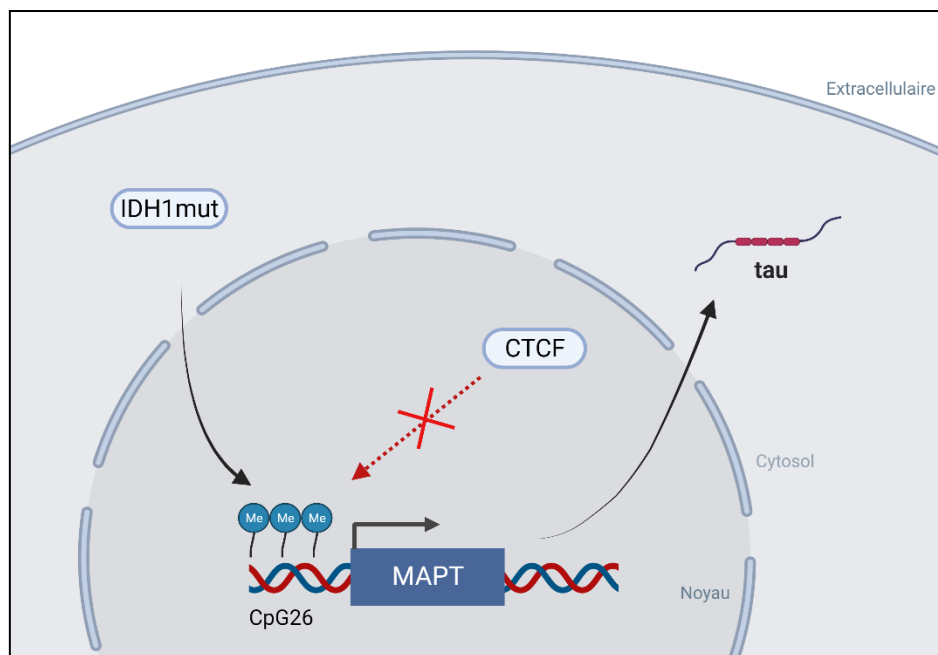
Au cours du développement, dans le cerveau, Drubin et collègues ont établi que la croissance neuritique, essentielle dans la mise en place de connexions entre neurones, est initiée par le NGF. L'étude montre que, dans les cellules de phéochromocytome de rat PC12, la stimulation du NGF initie la polymérisation des microtubules vers la membrane plasmique créant une évagination membranaire expliquant alors la croissance neuritique. Dans ces cellules, le NGF induit spécifiquement une augmentation d'expression



de tau, expliquant l'augmentation de la dynamique microtubulaire (Drubin *et al.*, 1985). Bien que le promoteur principal de tau, fortement actif dans les cellules PC12, ait une spécificité neuronale chez le rat (Sadot *et al.*, 1996), Andreadis et al ont montré que cette spécificité neuronale du promoteur de tau était vraie pour le rat et la souris mais pas pour l'Homme. En effet, ce promoteur induit l'expression de tau dans plusieurs tissus sains ainsi que dans la lignée de neuroblastome humain SK-N-SH (Andreadis *et al.*, 1996) et IMR32 (Cragg and Kalisch, 2014). A l'instar de la croissance neuritique, la stimulation autocrine par le NGF pourrait induire l'expression de tau dans certaines tumeurs mammaires (figure 8). Il est intéressant de noter que dans les études de Descamps et al et Dollé et al (Descamps *et al.*, 2001a; Dollé *et al.*, 2003), les auteurs ont montré que les récepteurs au NGF, p75<sup>NTR</sup> et p140<sup>TrkA</sup>, étaient exprimés dans les lignées cellulaires MDA-MB-231, MCF7 et T47D qui surexpriment toutes tau (Spicakova *et al.*, 2010).

### 3. Régulation épigénétique de l'expression de MAPT

La régulation de l'expression de *MAPT* pourrait s'effectuer par des modifications épigénétiques de son promoteur. En effet, dans certaines pathologies telles que la MA ou encore la maladie de Parkinson, une hypométhylation d'îlots CpG présente en amont de son promoteur a été associée à une augmentation de son expression (Coupland *et al.*, 2014; Iwata *et al.*, 2014). Par une approche de tri de noyaux issus de tissus post-mortem, les auteurs d'une de ces études ont pu mettre en évidence une hypométhylation du promoteur de *MAPT* aussi bien dans les neurones que dans des cellules non-neurales telles que des cellules gliales et de l'endothélium vasculaire (Iwata *et al.*, 2014). De même, une étude GWAS (*Genome-Wide Association Study*) réalisée sur des tissus post-mortem et des biopsies de patients a montré que *MAPT* était surexprimé dans une tauopathie rare, la PSP (Höglinger *et al.*, 2011). En 2016, Huin et collègues ont établi une corrélation entre une hypométhylation d'un îlot CpG présent dans le premier intron de *MAPT*, situé entre les exons 0 et 1 et sa surexpression dans le cortex frontal de patients atteints de PSP (Huin *et al.*, 2016).



**Figure 9. Mécanisme d'expression de MAPT dans les gliomes de bas grade.** La méthylation d'un promoteur est généralement associée à une répression génique. Dans les gliomes, l'hyperméthylation du promoteur de MAPT sur l'îlot CpG26 par les mutations IDH1 empêche le facteur répresseur de transcription CTCF de s'y fixer. Ce mécanisme induit l'expression de MAPT et la production de protéines tau dans les gliomes de bas grade (inspiré de (Gargini et al., 2020)) (Created with BioRender.com).

En plus des maladies neurodégénératives, les altérations de méthylation des séquences promotrices de gènes sont fréquemment retrouvées dans les cancers. Ces modifications épigénétiques modulent l'expression de différents gènes et sont associées à la progression tumorale ou encore à la résistance aux thérapies. On estime qu'environ la moitié des gènes humains possèdent des îlots CpG au sein de leur promoteur. Il est aujourd'hui admis que l'hyperméthylation de ces îlots CpG est caractéristique des cellules cancéreuses en comparaison avec les cellules saines dont les îlots CpG sont hypométhylés (Herman and Baylin, 2003). Shin et collègues ont notamment montré que l'expression de la méthyle transférase DNMT1 était plus importante dans les tumeurs mammaires de type triple négative et plus faible dans les cellules de type luminal A (Shin, Lee and Koo, 2016) menant à la modulation de l'expression génique (Kim *et al.*, 2019).

Dans les gliomes de bas grade (GBG), des tumeurs cérébrales touchant principalement les jeunes adultes, des méthylation aberrantes d'îlots CpG de certains gènes ont été rapportées. En effet, le phénotype méthylateur des îlots CpG (CIMP, *CpG island methylator phenotype*) caractéristique de

l'extinction de l'expression génique peut également être associée à une réexpression génique via l'altération de liaison du répresseur transcriptionnel CTCF (*CCCTC binding factor*). Dans les GBG, une forte association a été démontrée entre ce phénotype CIMP et des mutations de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH1/2) (Flavahan *et al.*, 2016). De manière intéressante, Gargini et al ont récemment montré une forte augmentation de la méthylation des îlots CpG présents dans la région 5'UTR de *MAPT* dans les GBG présentant des mutations de l'enzyme IDH1/2 (Gargini *et al.*, 2020). Aussi, l'analyse de la séquence de *MAPT* a permis de mettre en évidence la présence d'un site de liaison du facteur CTCF dans l'îlot CpG<sub>26</sub>. Cette hyperméthylation, généralement associée à une faible expression génique est ici responsable d'un défaut de liaison du facteur CTCF et est donc inductrice de l'expression de *MAPT* (figure 9). Enfin, dans les gliomes, le travail de Zaman et al a montré que l'hyperméthylation du promoteur de *MAPT* était fortement associée à une diminution de son expression (Zaman *et al.*, 2019).

Bien que tous ces éléments ne restent que des hypothèses quant à l'expression de *MAPT* dans les cancers, l'adoption de l'une ne signifie pas nécessairement l'exclusion des autres. En effet, en fonction du type de tumeur, des différents stimuli externes et du tissu dans lequel la tumeur se trouve, l'expression de *MAPT* peut être expliquée par différents mécanismes

## ii. Quelles espèces de tau retrouve-t-on dans les cancers ?

Spicakova et collaborateurs ont étudié le rôle de tau dans la résistance aux taxanes dans différentes lignées cellulaires de tumeurs mammaires. Dans leur étude, les auteurs ont montré que les six isoformes principales de tau du SNC sont retrouvées dans ce type tumoral (Spicakova *et al.*, 2010). Cependant, aucune étude à ce jour n'a cherché la présence d'autres isoformes dans les cancers. Nous ne pouvons donc exclure que les exons 4a, 6 et 8 de *MAPT* puissent être inclus dans les transcrits finaux (figure 1). Effectivement, les travaux de Andreadis en complément des bases de données ont permis de mettre en évidence l'inclusion de plusieurs exons dans les tissus périphériques (Andreadis *et al.*, 1996). De plus, les études de Loomis et al ont permis de montrer que l'isoforme 1N4R était l'isoforme majoritaire dans les noyaux de cellules de neuroblastomes SH-SY5Y (Loomis *et al.*, 1990). L'analyse des isoformes de tau dans les cancers n'a pour le moment pas été effectuée.

### iii. Les fonctions établies ou potentielles des protéines tau dans les cancers

La protéine tau, nous l'avons vu, a été largement étudiée dans les neurones en raison de son implication dans la MA et d'autres tauopathies. De ce fait, très peu d'études ont été réalisées sur l'effet de tau sur la croissance tumorale. Les paragraphes qui suivent visent donc à faire un état des lieux des différentes fonctions qui ont été attribuées à tau. Bien que certaines des fonctions qui seront décrites ont été appliquées à un contexte tumoral, d'autres n'ont été étudiées pour le moment que dans un contexte neurodégénératif.

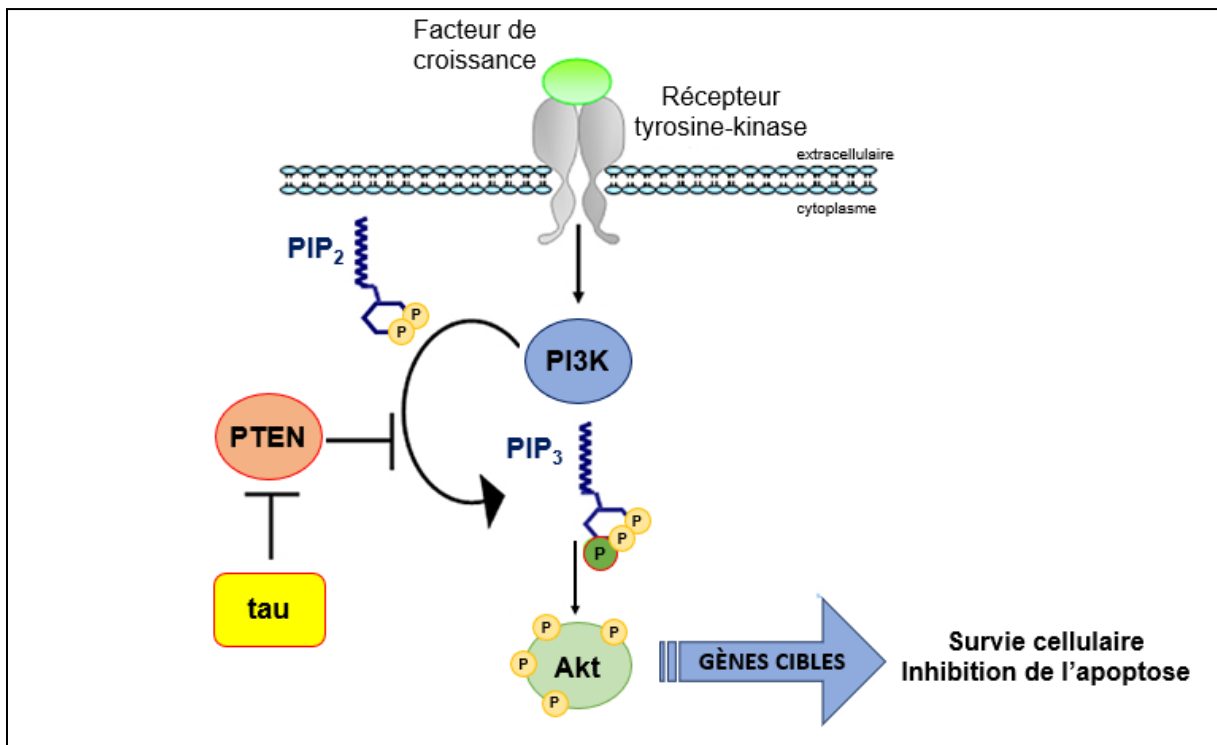
#### 1. Effets de tau sur la croissance tumorale

La croissance tumorale est définie par une prolifération importante due notamment à un échappement aux points de contrôles du cycle cellulaire ainsi qu'une résistance à l'apoptose. La cellule cancéreuse se divise alors indéfiniment. Un certain nombre d'éléments cellulaires participent et favorisent cette croissance tumorale. Parmi les éléments les plus connus, les voies de signalisation PI3k/Akt et MAPK sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires permettant la survie ou la mort cellulaire. Dans les cancers, ces voies de signalisation sont souvent altérées et favorisent cette croissance. Certains travaux ont permis de démontrer que tau pourrait jouer un rôle dans ces voies de signalisation.

##### a. PI3k/Akt : la voie de l'insuline

Brièvement, la voie de signalisation PI3k/Akt est considérée comme une voie pouvant être impliquée d'une part dans le cycle et la croissance cellulaires et d'autre part dans l'apoptose. Au départ de cette voie, on trouve un récepteur transmembranaire à domaine tyrosine kinase (RTK) stimulé par des facteurs externes, tels que les facteurs de croissance. La fixation du ligand sur son récepteur induit un changement conformationnel du récepteur qui mène à l'autophosphorylation de ses domaines intracellulaires. La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3k) est composée de 2 sous-unités : le peptide p85, comprenant un domaine régulateur ainsi que le peptide p110 qui possède une fonction catalytique. Alors que p85 interagit avec les domaines phosphorylés du récepteur, p110 phosphoryle le lipide membranaire phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) qui devient alors le second messenger cellulaire phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). A partir de là, PIP3 active la protéine Akt (également

nommée PKB) notamment par la phosphorylation de PDK1/2. La protéine Akt activée intervient alors dans plusieurs processus cellulaires (figure 10). Par exemple, il a été montré que Akt phosphoryle la protéine p21<sup>waf1/cip1</sup> sur sa thréonine 145 libérant ainsi la protéine PCNA d'un complexe p21/PCNA/CDK/Cyline et entraîne donc la réplication de l'ADN (Rössig *et al.*, 2001). Alors que certaines études attribuent à Akt un rôle anti-apoptotique (Peruzzi *et al.*, 1999) d'autres lui ont trouvé un rôle pro-apoptotique (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997). Néanmoins, les effets de la voie PI3k/Akt dans la majorité des cancers sont associés à l'agressivité tumorale (Chang *et al.*, 2003).



**Figure 10. Implication de la protéine tau dans l'activation constitutive de la voie de signalisation PI3k/Akt.**

La voie des PI3k/Akt peut être initiée par des facteurs de croissance. Elle entraîne l'activation de la protéine effectrice Akt qui permet l'expression de différents gènes cibles. Cette voie est régulée négativement par la protéine PTEN. L'activité de cette phosphatase est inhibée par la protéine tau ce qui entraîne une activation constitutive de la voie (modifié de (Molinari and Frattini, 2013)).

Une fois activée, Akt peut diminuer l'expression de gènes codants des protéines pro-apoptotiques telles que Bad et la procaspase 9 (Datta *et al.*, 1997) ainsi que FKHRL1 (Brunet *et al.*, 1999). Dans le contrôle du cycle cellulaire, une inhibition de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) par Akt a été associée à une translocation nucléaire du facteur de transcription  $\beta$ -caténine et permettant l'expression du gène codant la cycline D1 (Fresno Vara *et al.*, 2004). Plusieurs altérations de cette voie peuvent être

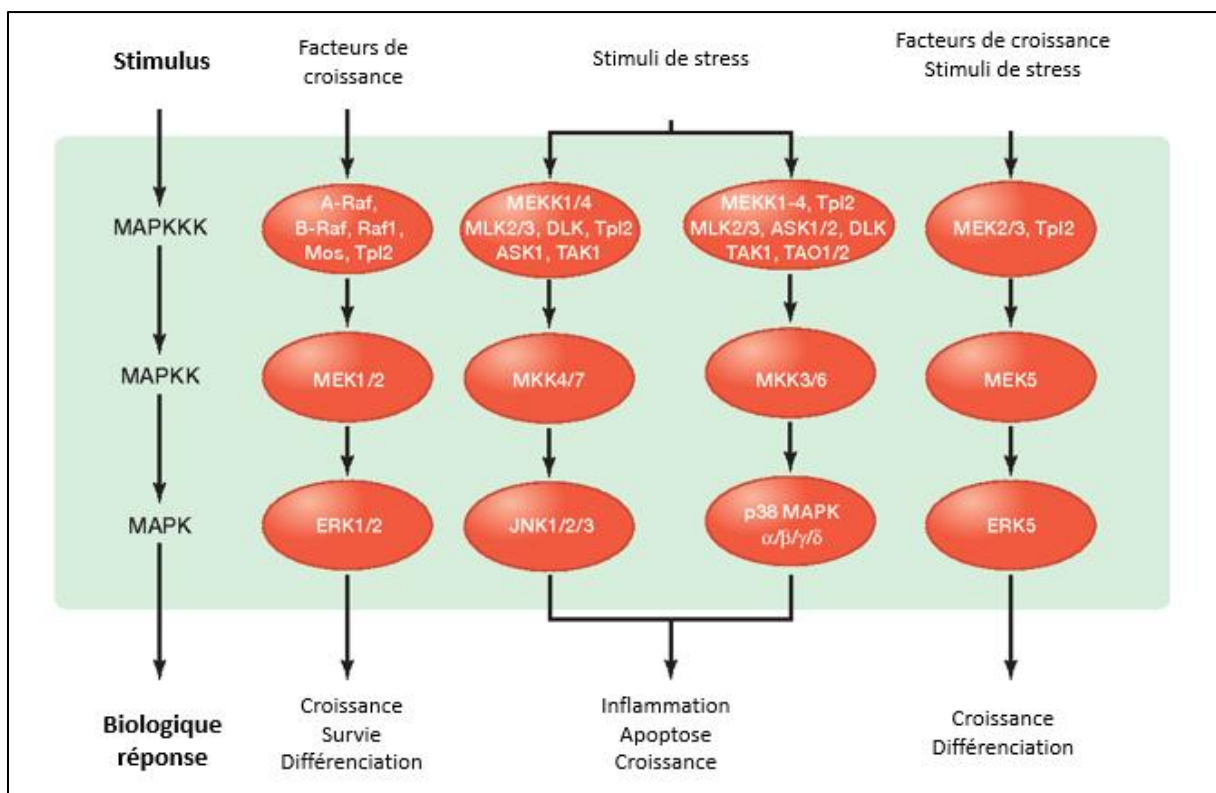
notées dans les cancers et font d'Akt une protéine clé dans la progression tumorale. Par ailleurs, le récepteur membranaire ErbB2/Her2 est sur-représenté dans les cancers mammaires de phénotype Her2+ (Ruiz-Saenz *et al.*, 2018), le gène codant PI3k est amplifié dans plusieurs cancers de l'ovaire et cervical (Testa and Bellacosa, 2001; Fresno Vara *et al.*, 2004) mais aussi Akt2, un membre de la famille des protéines Akt, qui est amplifié dans certains cancers mammaires et ovarien (Bellacosa *et al.*, 1995). Cette voie de signalisation est régulée négativement par *PTEN*, considéré donc comme un gène suppresseur de tumeur. En tant que phosphatase, PTEN agit en opposition à PI3k et retire le groupement phosphate de PIP3 pour reformer le lipide PIP2. Ainsi, le fonctionnement de la voie PI3k/Akt résulte d'un équilibre entre l'action de PI3k et celle de PTEN (Molinari and Frattini, 2013). Par conséquent, des mutations perte-de-fonctions de *PTEN* ont été retrouvées dans plusieurs tumeurs solides et permettent une activation constitutive de la voie PI3k/Akt favorable à la croissance tumorale (Milella *et al.*, 2015). Dans les carcinomes adénoïdes kystiques, une forme rare de tumeurs touchant notamment les glandes salivaires, la suractivation de la voie PI3k/Akt/IKK $\alpha$ /Nf- $\kappa$ B active l'expression de gènes anti-apoptotiques et promeut donc la survie et la croissance tumorale (Sun *et al.*, 2010).

Récemment, une étude réalisée sur la neurodégénérescence observée dans la MA a mis en évidence un lien entre tau et la voie PI3k/Akt. Les auteurs ont en effet montré que des souris déficientes en tau (KO-tau) exhibaient de sévères altérations de la signalisation à l'insuline. A l'inverse, la surexpression de l'isoforme 1N4R de tau dans les cellules de neuroblastome N1E115 était plus sensible à l'insuline. Par coimmunoprécipitation (CoIP), les auteurs ont décelé une interaction directe entre tau et PTEN. Les effets d'une telle interaction ont été élucidés par une approche par BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) et montrent que tau inhibe l'activité phosphatase de PTEN (Marciniak *et al.*, 2017). Ce nouveau rôle attribué à tau a été confirmé plus récemment par les travaux de l'équipe de Tai qui ont montré, dans les comportements de type autistiques, une suractivation de la voie de signalisation PI3k/Akt/mTOR par tau. Dans cette étude, les auteurs ont montré par des techniques de PLA (*Proximity Ligation Assay*) et BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) une interaction directe entre PTEN et le PRD de tau résultant en une diminution de la conversion de PIP3 en PIP2 (Tai *et al.*, 2020). De manière intéressante, Schroeder et al ont établi une corrélation entre des délétions de *PTEN* et de fortes concentrations de tau dans les cancers prostatiques (Schroeder *et al.*, 2019). Ces dernières études montrent que la protéine tau, dans certains cas, peut maintenir une activation constitutive de la voie PI3k/Akt (figure 10). Dans certains cancers, l'expression de *MAPT* pourrait ainsi résulter d'une activation de cette voie. L'ensemble de ces études menées sur les dérégulations de la voie PI3k/Akt dans

les cancers ainsi que les relations que tau entretient avec cette voie permet d'émettre l'hypothèse d'un effet de tau sur la croissance tumorale.

### b. Tau et les MAP-kinases

La voie de signalisation des MAPK fait également partie des voies les plus étudiées car fréquemment dérégulées dans les cancers. Brièvement, cette voie de signalisation peut être définie par trois cascades de signalisation distinctes : la voie des protéines ERKs (*Extracellular-signal Regulated Kinases*) comprenant les protéines ERK1 et ER2, la voie JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*) comprenant les isoformes JNK1, JNK2 et JNK3 et la voie p38/SAPKs MAPKs (*Stress-Activated Proteins Kinases*) impliquant les protéines p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , and p38 $\delta$ . A l'instar de la voie PI3k/Akt, les voies MAPK commencent au niveau d'un récepteur membranaire activé par des facteurs de croissance, des facteurs mitotiques, des cytokines ou encore des facteurs de stress (figure 11) (pour revue (Morrison, 2012)).



**Figure 11. Les voies des MAP-kinases.** L'activation du récepteur débouche sur une cascade de phosphorylations de protéines MAPKKK, MAPKK et MAPK jusqu'à la transcription de gènes cibles. La voie

ERK est principalement activée par des facteurs de croissance et mène à une augmentation de la croissance et de la différenciation cellulaire. La voie JNK est généralement associée aux réponses au stress (rayonnements ionisants générant stress oxydant et endommagement de l'ADN) mais est également sensible aux facteurs de croissance et régule l'apoptose, l'inflammation et le métabolisme cellulaire. Enfin, la voie p38 est régulée par les facteurs de stress environnementaux mais aussi par les cytokines et contrôle alors des processus tels que l'inflammation, l'apoptose, la progression du cycle cellulaire et la différenciation (Morrison, 2012).

Tout comme la voie PI3k/Akt, des mutations dans plusieurs gènes impliqués dans les voies MAPK ont été retrouvés dans certains cancers. Parmi eux, des mutations de Ras sont retrouvées, selon la database COSMIC, dans plus de 30% des tumeurs solides. Les gènes *K-RAS* (*Kirsten Ras*), *H-RAS* (*Harvey RAS*) et *N-RAS* (*Neuroblastoma RAS*), sont souvent mutés dans les cancers colorectaux et font partie des cibles de traitements thérapeutiques en raison de leur implication dans l'agressivité de la tumeur (pour revue (Fang and Richardson, 2005)). Le facteur de croissance NGF est un des initiateurs de cette voie et est notamment impliqué dans la croissance des carcinomes mammaires. En effet, il a été montré que plusieurs lignées cellulaires de cancers du sein exprimaient les récepteurs membranaires du NGF : TrkA et p75<sup>NTR</sup> et favorisaient la croissance tumorale à travers la voie MAPK (Descamps *et al.*, 2001b; Retamales-Ortega *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018; Di Donato *et al.*, 2019). Il est intéressant de noter que le NGF a été historiquement décrit dans le développement des réseaux neuronaux et dont l'action entraîne une augmentation d'expression de tau (Drubin *et al.*, 1985). Dans leur étude, Leugers et al ont mis en évidence une augmentation d'expression de *MAPT* par le NGF et ont démontré un effet activateur de tau sur les protéines MEK1 et ERK1/2 (Leugers and Lee, 2010). Corroborant cette étude, Perea et collègues ont confirmé un effet potentialisateur de tau sur la voie MAPK dans les cellules microgliales. En utilisant des modèles murins et des cultures primaires de microglie, les auteurs de l'étude ont mis en évidence que des pré-traitements de protéines tau extracellulaires permettait un relargage de cytokines pro-inflammatoires à travers l'activation de la voie p38/MAPK (Perea, Ávila and Bolós, 2018). Aucune des études de Leugers et al et Perea et al ne décrit pourtant un mécanisme précis par lequel tau participerait à l'activation de la voie MAPK. De plus, l'étude de l'interactome de tau (Gunawardana *et al.*, 2015a) ne montre pas d'interaction de tau avec les protéines clés impliquées dans cette voie (MAPK, Ras, Raf, MEK, ERK, JNK, p38). En revanche, il existe des transactivations réciproques entre les voies PI3k/Akt et MAPK (Braicu *et al.*, 2019) qui pourrait expliquer l'effet de tau sur la voie MAPK.

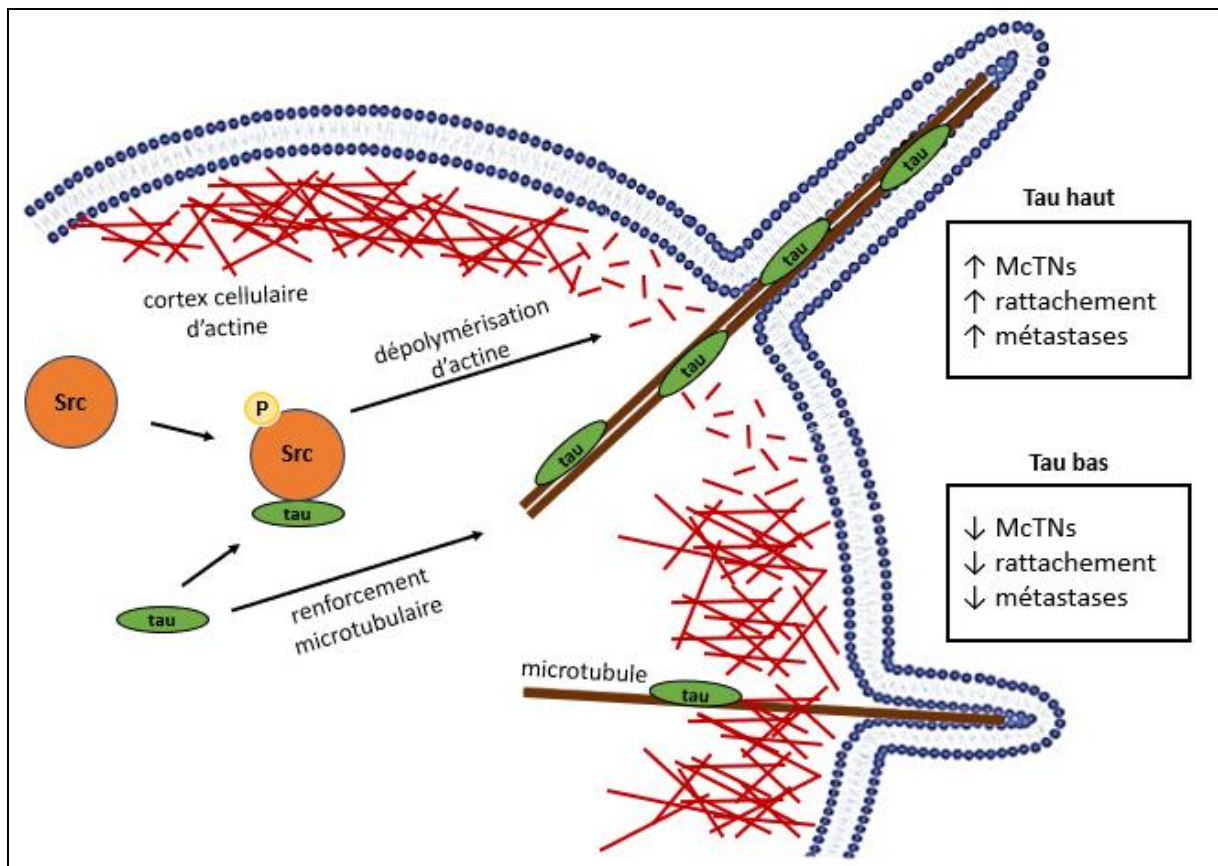


Des travaux publiés en 2016 ont montré que la simvastatine, un médicament utilisé pour la diminution des taux de LDL et triglycérides sériques, pouvait induire l'apoptose dans certains cancers du sein. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence une altération par la simvastatine des voies PI3k/Akt et MAPK menant à la mort cellulaire. Alors que toutes les lignées utilisées confirmèrent l'effet dose-dépendante de ce composé, les cellules MCF7 et T47D affichèrent une faible activité apoptotique, un peu plus élevée dans la lignée MDA-MB-231 et quasiment totale dans la lignée BT-549. De manière intéressante, les lignées MCF7 et T47D expriment fortement tau, la lignée MDA-MB-231 l'exprime à des taux plus bas alors que la lignée BT-549 en est dépourvu (Spicakova *et al.*, 2010). Dans leur discussion, les auteurs expliquent cette hétérogénéité de réponse à la simvastatine par le caractère œstrogène-dépendant des cellules MCF7 et T47D (Wang *et al.*, 2016). Toutefois, la possible implication de tau dans les voies MAPK et PI3k/Akt dans ces cancers pourrait également intervenir cette résistance à la simvastatine.

En conclusion, des études menées principalement dans un contexte neuronal ont montré que tau est un régulateur positif des voies ERK/MAPK et p38/MAPK ainsi que de la voie PI3k/Akt. Celles-ci favorisant la croissance et la survie des cellules cancéreuses, il serait intéressant de déterminer le rôle exact que tau joue sur ces voies de signalisation dans un contexte cancérologique.

### c. Évasion métastatique et invasion tissulaire

Afin d'évaluer l'évolution d'un cancer, la nomenclature universelle utilisée est basée sur leur différenciation, le grade et leur extension hors du tissu d'origine, le stade. Brièvement, le grade définit des caractéristiques histologiques telles que le degré de différenciation, l'activité mitotique ou encore l'extension de la nécrose. Des scores sont attribués par les anatomopathologistes en fonction de chaque type de cancer. Par exemple, le score de Scarff-Bloom-Richardson définit les adénocarcinomes mammaires quand le score de Gleason caractérise les adénocarcinomes prostatiques. En plus du grade, le stade des tumeurs permet d'évaluer leur potentiel d'extension. On définit alors par la lettre T l'étendue de la tumeur au niveau des tissus voisins, la lettre N pour l'atteinte ganglionnaire dans la région de la tumeur et M pour les métastases. On attribue ensuite un chiffre qui suit chacune de ces lettres pour ainsi obtenir T0 à T4, N0 à N3 et M0 ou M1. Plus le chiffre est élevé, plus le paramètre considéré est grave. L'expansion d'une tumeur de son site d'origine aux tissus et ganglions proximaux jusqu'aux organes distaux constitue un critère de gravité important.



**Figure 12. Modèle de l'implication de la protéine tau dans la formation des microtentacles nécessaires au processus métastatique.** La protéine tau interagit avec la protéine Src ce qui entraîne la dépolymérisation de l'actine corticale. Le renforcement d'un réseau microtubulaire par tau permet une évagination de la membrane plasmique alors démasquée. Modifié de Matrone et al., 2010 (Matrone et al., 2010).

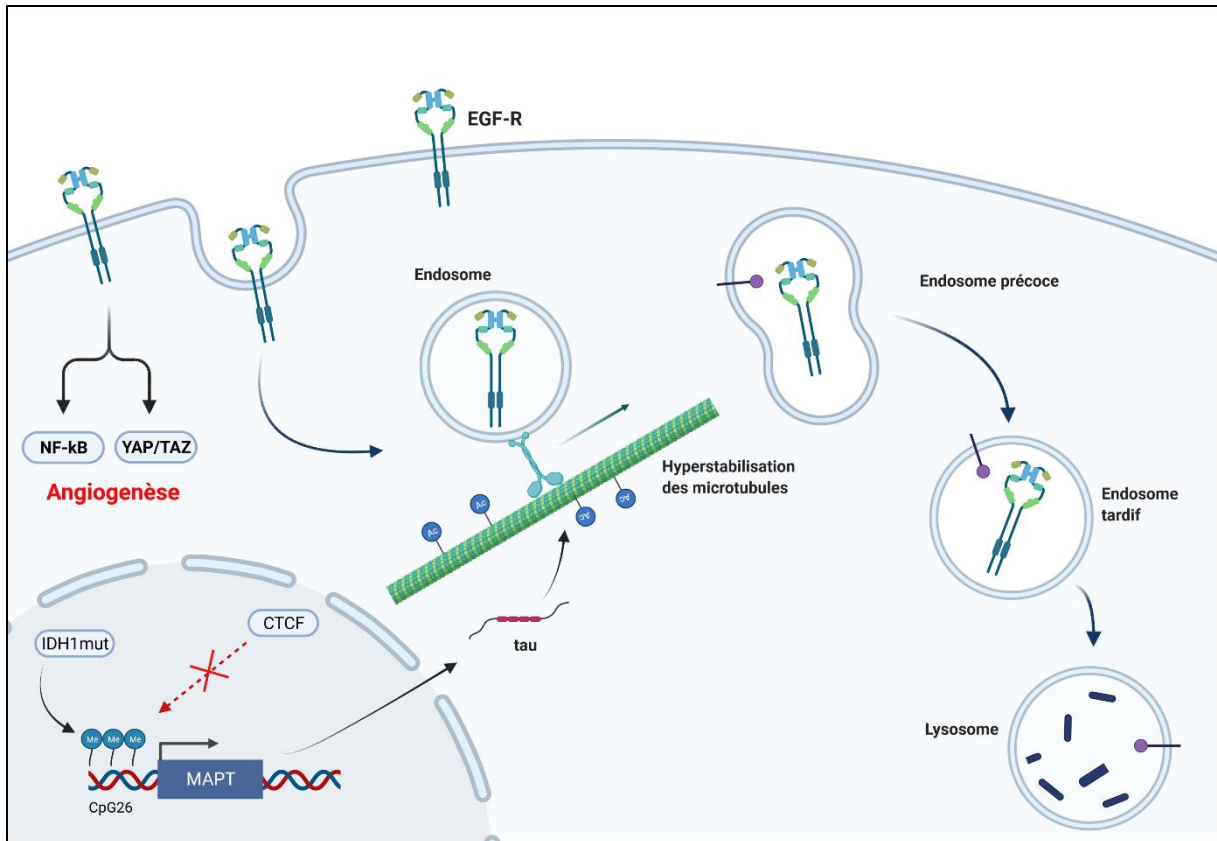
Ainsi, la formation de métastases représente généralement des cancers agressifs. Ces dernières démarrent avec l'invasion de cellules tumorales dans les systèmes vasculaire et lymphatique. On parle dans ce cas de cellules tumorales circulantes (CTCs). Une fois en suspension, les cellules peuvent adhérer aux cellules endothéliales pour envahir un organe cible. À cette fin, les CTCs modifient leurs filaments d'actine, filaments intermédiaires et leurs microtubules de façon à ce que la cellule en circulation puisse se rattacher au tissu cible. Ce processus passe notamment par une polymérisation accrue des microtubules vers la membrane plasmique, formant une évagination en une structure appelée microtentacule (McTN) (Fife, McCarroll and Kavallaris, 2014). Cet évènement n'est pas sans rappeler le processus de formation des neurites au cours du développement du cerveau embryonnaire. En effet, Drubin et collègues montrent dès 1985 que le neurone en formation, stimulé par le NGF, augmentait l'expression de tau qui entraînait alors une augmentation de la dynamique de polymérisation des

microtubules vers la périphérie de la cellule, créant ainsi l'évagination (Drubin *et al.*, 1985). A l'instar de la neurogenèse, un rôle similaire a été démontré pour tau dans le processus métastatique. Dans leur étude, Matrone *et al.* ont montré que tau était essentiel dans la polymérisation des microtubules dans les McTNs. De plus, les auteurs rapportent une expression de *MAPT* dans 52% des patients présentant des métastases dont 26% affichant même une surexpression. Ces résultats montrent que tau participe activement au processus métastatique au travers du rattachement des cellules circulantes sur leur tissu cible (figure 12) (Matrone *et al.*, 2010). Récemment, une étude rétrospective a évalué la présence de différents biomarqueurs significativement augmentés dans le sérum de patients ayant présenté des métastases cérébrales. Les résultats de cette étude ont montré que les patients ayant des cancers non métastatiques avaient une concentration médiane de tau sérique de 1,16 pg/mL contre 1,56 pg/mL pour les patients avec métastases cérébrales. De plus, les statistiques prédisent pour les patients avec métastases une augmentation du risque d'avoir des concentrations de tau sériques atteignant des concentrations au-delà de 3,17 pg/mL. Les auteurs concluent tout de même que ces résultats devront être reconfirmés (Darlix *et al.*, 2019). L'expansion d'une tumeur jusqu'à des organes distants du tissu d'origine est caractéristique d'un stade avancé. Les récentes études réalisées sur l'invasion métastatique témoignent que tau joue un rôle important dans ces tumeurs agressives.

#### d. Protéine tau et angiogénèse

Les études réalisées sur les tauopathies font état d'un certain nombre d'altérations, dont l'une d'entre elle constitue la vascularisation cérébrale (Albrecht *et al.*, 2020; Nichols *et al.*, 2021). Dans leur étude, Bennett et collègues ont généré des souris transgéniques Tg4510 porteuses de la mutation P301L de tau afin d'étudier l'impact de cette perte de fonction de tau sur la vascularisation. Les auteurs ont alors remarqué que la mutation P301L était associée à une augmentation de la vascularisation générale mais dont le diamètre des capillaires était fortement réduit. La conséquence directe de cet événement est une morphologie anormale de la vascularisation et des mouvements de vaisseaux sanguins perturbés. En complément de cette observation phénotypique, cette étude met en évidence une augmentation du gène *PAI-1* (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) chez ces souris transgéniques P301L ainsi que dans les cerveaux AD dans lesquels on observe une perte-de-fonction de tau (Bennett *et al.*, 2018). La fonction de PAI-1 a été rapportée comme étant pro-angiogénique dans certains cas (McCann *et al.*, 2019) et anti-angiogénique dans d'autres (Stefansson *et al.*, 2001). Autrement dit, des altérations de la vascularisation

semble être une conséquence d'une perte de fonction de tau. Dans les cancers, l'angiogenèse constitue un paramètre d'agressivité important. Bien qu'un faible nombre de travaux ne se soit consacré à l'étude des mécanismes impliquant tau dans les cancers, ceux de Gargini et al dans les GBG et les glioblastomes mettent en exergue un effet intéressant de tau. Dans ces tumeurs, le récepteur à l'EGF (EGFR) est recyclé par la voie endolysosomale. Les auteurs ont montré que la protéine tau, dans ces tumeurs, altère ce recyclage et par conséquent limite l'angiogenèse (figure 13).



**Figure 13. Effet de tau dans le processus d'angiogenèse dans les gliomes de bas grade.** Le récepteur à l'EGF est fréquemment surexprimé dans les tumeurs cérébrales. La protéine tau entraîne une hyperstabilisation des microtubules qui perturbe le recyclage intracellulaire de ce récepteur qui est alors dégradé. La signalisation sous-jacente impliquant le facteur de transcription Nf-κB et les protéines YAP/TAZ est inhibée ce qui limite le déclenchement de l'angiogenèse (Gargini *et al.*, 2020) (Created with BioRender.com).

Les gliomes surexprimant tau ont un réseau microtubulaire hyperstable d'une part en raison du rôle direct de tau mais également parce que les microtubules deviennent acétylés. Cette absence de motilité des microtubules mène à une séquestration de l'EGFR présent dans les endosomes pour y être dégradé en suivant la voie endolysosomale. Cette dégradation plus importante se traduit par une diminution de

la quantité de ce récepteur chez les patients ayant des gliomes tau positifs et naturellement par une diminution de la voie de signalisation sous-jacente (figure 13). En effet, les auteurs ont montré dans un modèle de xénogreffes de souris que cette baisse d'activité du récepteur à l'EGF était associée à une plus faible proportion de vascularisation autour du gliome. Dans cette étude, la protéine tau est défavorable à l'angiogenèse et associée à une meilleure survie des patients (Gargini *et al.*, 2020). La principale protéine impliquée dans la déacétylation de la tubuline est l'histone déacétylase 6 (HDAC6). Perez et ses collègues ont montré dans les cerveaux de patients Alzheimer et dans des modèles de souris déficientes en tau que les microtubules étaient hyperacétylés. Les auteurs de ce travail ont associé cette hyperacétylation à un effet inhibiteur de tau sur l'activité déacétylase de HDAC6 (Perez *et al.*, 2009). La protéine tau dans les tumeurs cérébrales semble donc défavorable à l'angiogenèse. À l'inverse, la diminution de *HDAC6* dans des cellules de carcinome hépatique promeut l'angiogenèse et est associée à un mauvais pronostic pour les patients (Lv *et al.*, 2016). Cette fonction inhibitrice de tau peut donc être favorable aux patients dans certains types tumoraux et défavorable par l'intermédiaire de l'activité de HDAC6 dans d'autres. Cependant, les mécanismes cellulaires menant à l'angiogenèse sont divers et variés et n'impliquent pas uniquement les microtubules et la protéine HDAC6. Le rôle de tau dans le processus angiogénique dans les cancers n'est pas totalement clair et mérite donc d'être étudié de manière plus approfondie.

Le niveau d'agressivité d'une tumeur peut donc être défini par ses voies de signalisation, son caractère invasif ou sa propension à générer une angiogenèse. Toutefois, d'autres paramètres sont à prendre en compte. En effet, les traitements thérapeutiques administrés aux patients peuvent, dans certains cas, s'avérer inefficaces. Ce phénomène appelé *résistance thérapeutique* peut être de nature intrinsèque à la tumeur ou acquise à la suite d'un traitement. Les causes de ces résistances sont majoritairement dues à des modifications génétiques, épigénétiques et du microenvironnement dans lequel la tumeur réside (voir Chapitre 2, 1. *Généralités sur les thérapies et les résistances*). Les fonctions de tau établies dans les neurones peuvent, pour certaines d'entre elles, constituer des mécanismes de résistance à différentes thérapies anticancéreuses. En effet, la fonction microtubulaire de tau a été associée à une résistance aux taxanes, des molécules utilisées comme poison du fuseau mitotique (voir Chapitre 2, 2. b. ii. *Présence de protéines associées aux microtubules*). Toutefois, les autres fonctions qu'elle assure en particulier celles dans la stabilité génomique et l'organisation de la chromatine peuvent également réduire l'efficacité de certains traitements. Le chapitre suivant a pour but d'introduire la protéine tau et certaines des fonctions qu'elle assure dans un cadre de résistance thérapeutique.



## **CHAPITRE 2 :**

### **La protéine tau et la résistance thérapeutique**

#### **La survie des tumeurs**

Bien que nous progressions dans la compréhension des mécanismes menant à la cancérogenèse, la prise en charge des cancers reste un enjeu majeur. Une fois établi, le choix des thérapies dépend du type de cancer, de son stade, son grade, le tissu d'origine et d'autres facteurs. En complément de la chirurgie, plusieurs traitements existent pour traiter un cancer : la chimiothérapie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie ou encore les thérapies ciblées. Ces thérapies visent à altérer une ou plusieurs fonctions cellulaires ou endommager directement des composants de la cellule tumorale. Bien que ces thérapies soient efficaces dans beaucoup de cas, certains cancers affichent cependant une résistance intrinsèque ou acquise à ces traitements.

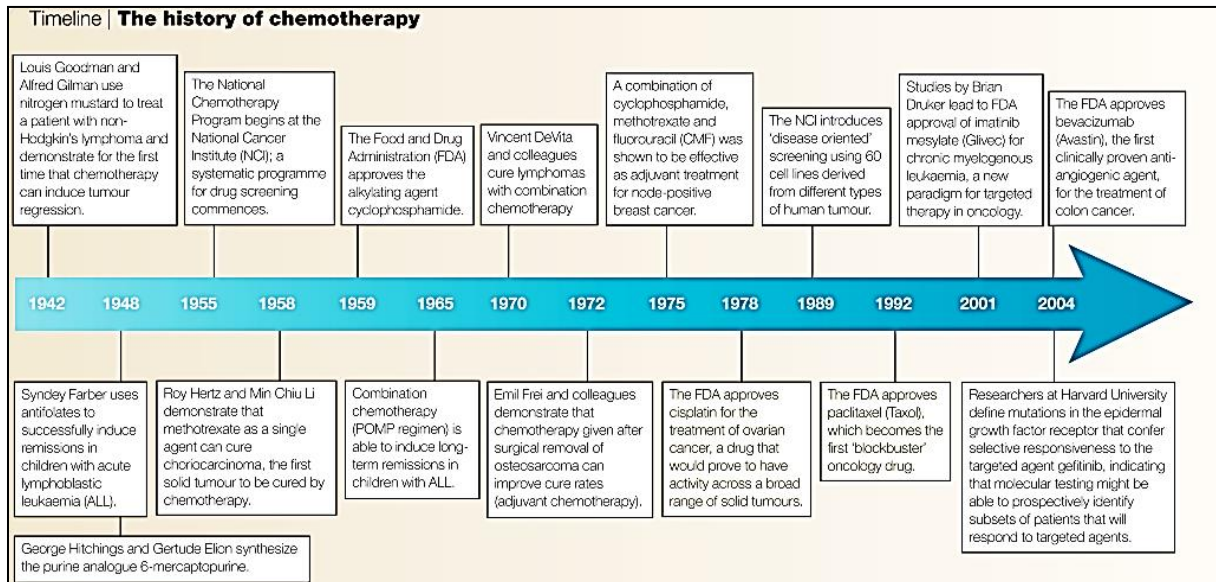
Ce deuxième chapitre vise donc à présenter les thérapies existantes et les résistances qui leur sont associées. D'abord, les différentes chimio- et radiothérapies employées dans le traitement des cancers seront passées en revue. Puis, pour chacune de ces thérapies, les différents mécanismes de résistance mis en place par la cellule cancéreuse seront décrits. Nous verrons à travers ce chapitre comment la protéine tau peut intervenir directement ou indirectement dans plusieurs de ces mécanismes de résistance thérapeutique

### 1. Généralités sur les thérapies et les résistances

Jusqu'à la première moitié du XXe siècle, la chirurgie restait le meilleur moyen de traiter un cancer. Cependant, elle ne permettait pas de traiter les cancers hématologiques ou métastatiques et avait donc un faible taux de réussite. La radiothérapie arriva presque immédiatement après la découverte des rayons X par Wilhelm Röntgen en 1895 et se développa 50 ans plus tard avec la création des accélérateurs linéaires à particules (LINAC, *Linear Particles Accelerator*). Cette avancée majeure dans le traitement des cancers restait tout de même limitée à un effet local ou régional. Dans les années 1940, deux pharmacologistes, Louis Goodman et Alfred Gilman testèrent l'effet de moutardes azotés et de molécules de la famille des antifolates sur des souris porteuses de tumeurs lymphoïdes. Les résultats étant concluant, ils réalisèrent une première injection chez un patient atteint d'un lymphome non hodgkinien. Ils observèrent une régression de la masse tumorale. Cette rémission, cependant, ne dura que quelques semaines puisque le cancer revint naturellement. Ce premier traitement marqua le début de l'ère de la chimiothérapie. Il permit également, de manière fortuite, de mettre en évidence le principe de résistance thérapeutique (Chabner and Roberts, 2005).



Depuis, les décennies qui suivirent virent l'avènement de chimiothérapies et de radiothérapies dont l'efficacité sur les tumeurs est de plus en plus importante (figure 14). En parallèle, nous découvrons fréquemment des mécanismes de résistance thérapeutique qui contrebalancent les effets positifs apportés par ces traitements. Certains sont généraux à plusieurs thérapies alors que d'autres sont inhérents à un type de traitement.



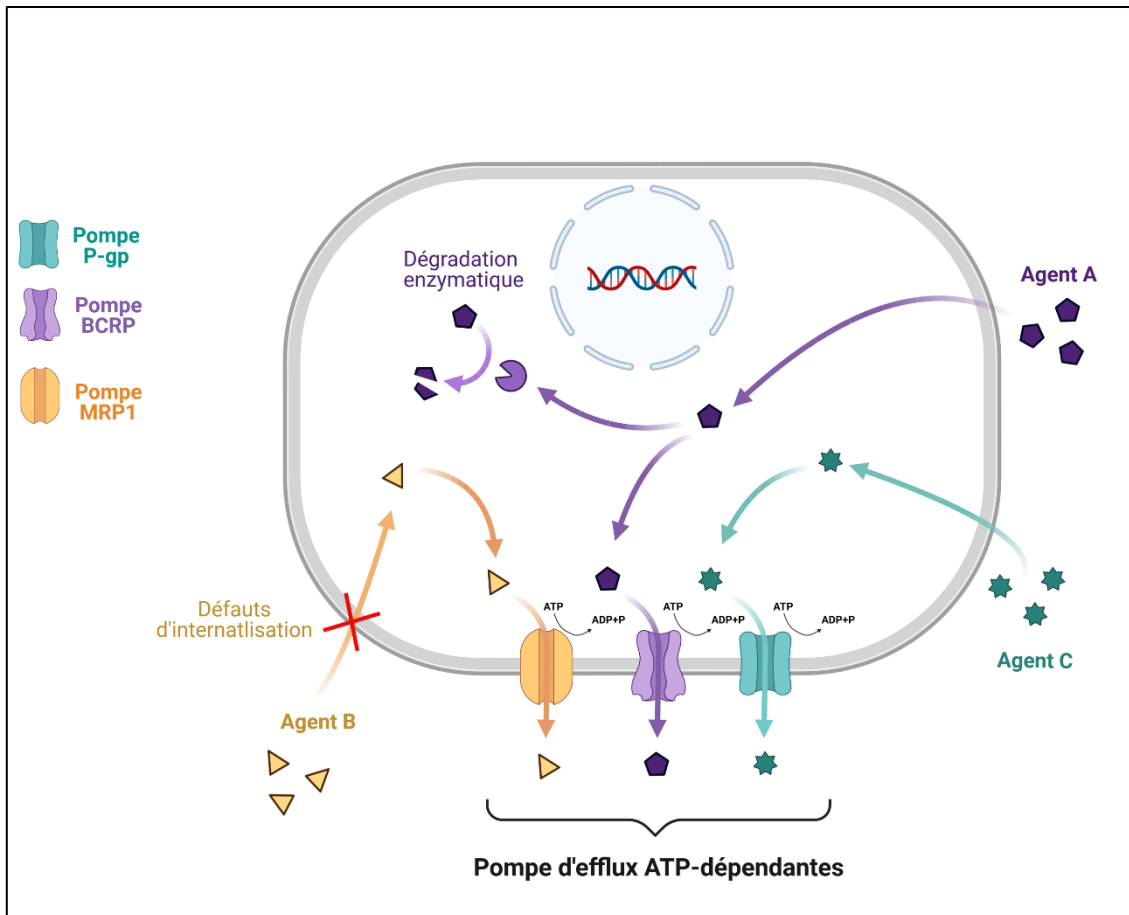
**Figure 14. Évolution des thérapies anti-cancéreuses.** La chimiothérapie conventionnelle commence dans la période d'après-guerre avec Louis Goodman et Alfred Gilman qui remarquèrent un effet antinéoplasique de certains gaz moutarde. Depuis, un nombre important de molécules, naturelles ou synthétiques, ont été développées et approuvées dans le traitement des cancers (figure de (Chabner and Roberts, 2005)).

La radiothérapie consiste en l'application locorégionale de rayonnements ionisants. Les premières radiothérapies utilisaient la désintégration de noyaux radioactifs tels que le radium, le cobalt ou encore le césium. La source radioactive est alors placée dans une zone stratégique de la tumeur afin d'émettre ses rayonnements sur les cellules cancéreuses et limiter l'impact sur les cellules saines. Cette méthode appelée curiethérapie ou brachythérapie est encore utilisée aujourd'hui pour les cancers du sein, de la prostate, du col de l'utérus ou de la peau. La radiothérapie dite externe utilise des rayons de haute énergie dont la source est extérieure à l'organisme. Elle s'est notamment développée à la fin des années 1940 grâce à l'apparition des LINAC et génère des faisceaux d'électrons appelés rayons X.

La chimiothérapie consiste en l'utilisation de molécules naturelles ou synthétisées en laboratoire pour agir sur la tumeur. Elle est une thérapie dite systémique puisqu'elle agit sur l'ensemble des cellules de

l'organisme. Cependant, la nature proliférative incontrôlée des cellules cancéreuses les rend particulièrement sensibles à ce type de traitement. Aujourd'hui, la chimiothérapie conventionnelle comporte deux familles principales de molécules : (1) les agents ciblant les microtubules (MTA, *Microtubule targeting agents*) fixent la tubuline libre ou dimérisée afin de bloquer la dynamique microtubulaire et (2) les agents endommageant l'ADN (DDA, *DNA Damaging Agents*) qui ciblent directement la séquence nucléotidique et génèrent des dommages à l'ADN. Les types de dommages les plus recherchés par ce type de traitements sont les cassures double brin (CDB) d'ADN puisqu'ils sont les plus toxiques pour la cellule. D'autres types de molécules peuvent également être utilisées dans le cadre de thérapies ciblées telles que les hormones dans l'hormonothérapie, les immunoglobulines dans le cadre de l'immunothérapie ou encore des épidrogues qui ciblent des mécanismes épigénétiques. Seul ce dernier type de traitement sera décrit en plus de la chimiothérapie conventionnelle et de la radiothérapie dans les pages suivantes.

Bien que ces thérapies soient pour la plupart efficaces contre la tumeur, certaines d'entre elles affichent tout de même une résistance à plusieurs types de traitement. Parmi les résistances à plusieurs molécules (en anglais, « *Multidrug resistance* ») les plus fréquemment retrouvées dans les cellules cancéreuses, nous trouvons les pompes d'efflux. Celles-ci permettent un transport actif, par hydrolyse de l'ATP, des molécules présentes dans le cytosol vers le domaine extracellulaire. Dans les cancers, nous pouvons retrouver des pompes de type P-gp (en anglais, « *P-glycoprotein* »), BCRP (en anglais, « *Breast cancer resistance protein* ») ou encore MRP1 (en anglais, « *Multidrug resistance-associated protein 1* ») (Mansoori *et al.*, 2017). En plus de ces transports transmembranaires, des enzymes spécifiques peuvent être produites par la cellule cancéreuse pour inactiver le principe actif de la molécule thérapeutique (figure 15). La cible de molécules thérapeutiques peut également être la cause d'une résistance thérapeutique. C'est le cas par exemple de la doxorubicine, une molécule qui sera décrite dans les paragraphes suivants, et dont l'efficacité est réduite en présence de mutations de sa cible, la topoisomérase II (Housman *et al.*, 2014). L'efficacité des molécules thérapeutiques repose sur leur capacité à induire la mort cellulaire. Certaines cellules cancéreuses affichent des mutations de gènes codant des protéines impliquées dans l'apoptose induisant une résistance à ces traitements (Holoohan *et al.*, 2013). Enfin, l'hétérogénéité tumorale peut également jouer un rôle dans la résistance thérapeutique. En effet, une tumeur n'est pas une masse uniforme de cellules identiques les unes aux autres. Ainsi, certaines cellules d'une population peuvent avoir une sensibilité différente et se développer pour former une masse tumorale résistante (pour revue (Housman *et al.*, 2014; Mansoori *et al.*, 2017)).



**Figure 15. Mécanismes de résistance thérapeutiques généraux.** L'efficacité des molécules utilisées en chimiothérapies peut être limitée par des défauts d'entrée dans la cellule, par une sécrétion de celles-ci mais également par une modification de leur structure ou de leurs cibles intracellulaires (Created with BioRender.com).

Bien que ces mécanismes généraux soient efficaces contre plusieurs types de traitements, ils sont souvent accompagnés de mécanismes spécifiques à un type de traitement particulier. Ces résistances thérapeutiques ciblées sont généralement associées à un mauvais pronostic pour les patients.

## 2. Les poisons du fuseau mitotique

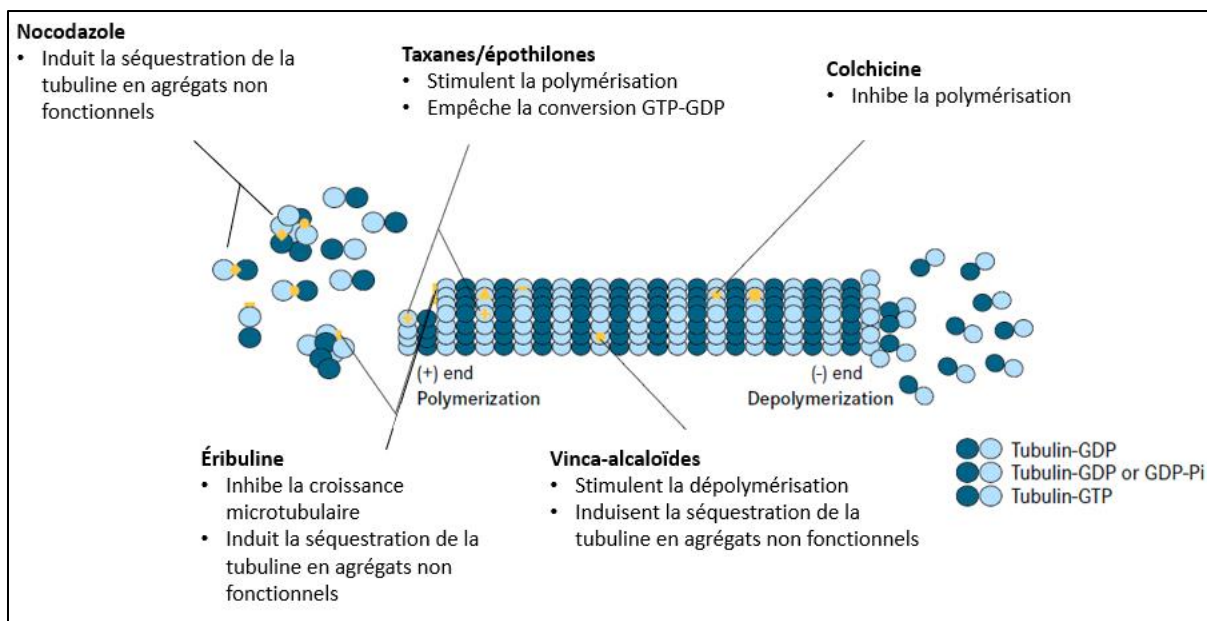
### a. Les thérapies

Les microtubules font partie des éléments essentiels au bon fonctionnement d'une cellule. Ils remplissent plusieurs fonctions cellulaires telles que le transport de cargos ou encore la séparation du matériel

génétique pendant la mitose. Ces fonctions sont rendues possibles par une caractéristique spécifique des microtubules qu'on qualifie de « dynamique instable ». En effet, les microtubules sont en constante polymérisation-dépolymérisation ce qui en fait une cible intéressante en thérapie. Cette famille de composés également appelées « poisons du fuseau mitotique » (*Spindle poisons*) comporte des molécules, naturelles ou synthétiques, qui peuvent être classées dans deux groupes : les déstabilisateurs qui accentuent la dépolymérisation des microtubules ou les stabilisateurs qui accroît leur polymérisation.

i. Les stabilisateurs des microtubules : taxanes et épothilones

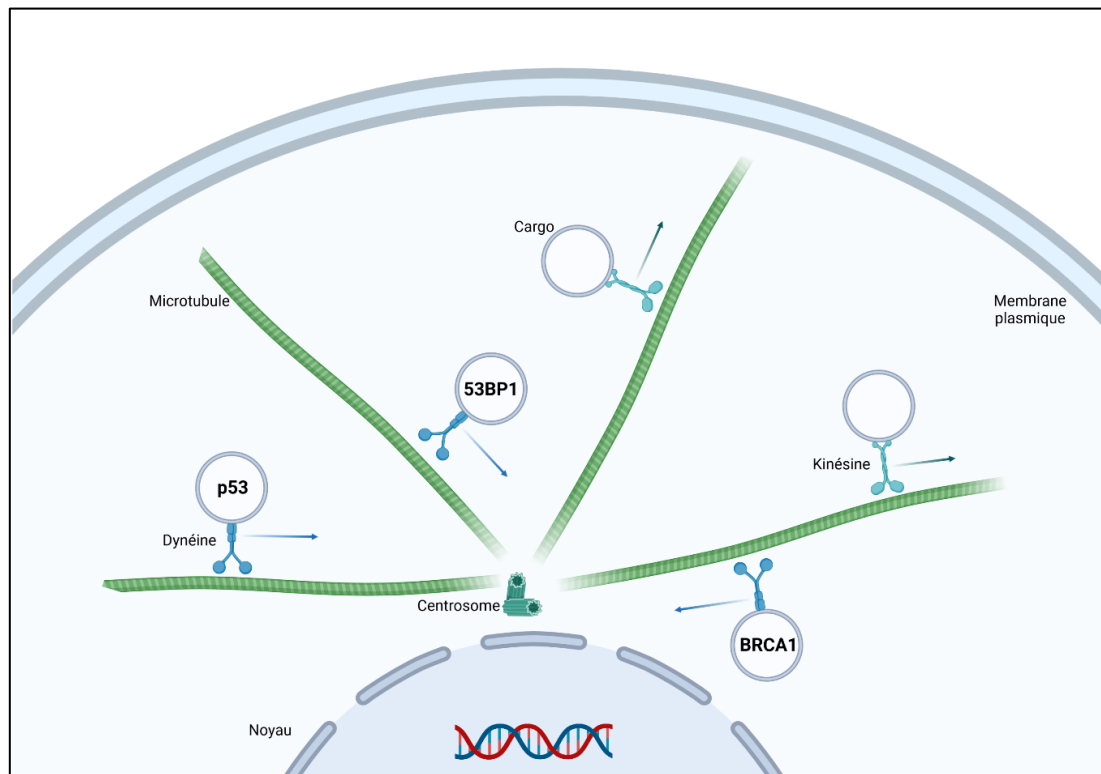
Dans le cadre de la recherche de composés naturels utilisables dans le traitement des cancers, en 1964, des échantillons d'écorce de l'espèce *Taxus brevifolia* (If de l'Ouest), furent analysés au *Research Triangle Institute*. Les recherches qui suivirent, notamment par Monroe Wall et Mansukh Wani ont permis d'isoler le paclitaxel, une molécule appartenant à la famille des diterpènes. Le paclitaxel est utilisé en thérapie anticancéreuse sous le nom de Taxol. En raison d'une faible quantité de matériel pouvant être récolté dans l'écorce de *Taxus brevifolia*, des recherches furent menées sur une espèce de la même famille : *Taxus baccata* (If commun). Le fruit de ce travail a alors permis d'isoler une autre molécule présentant de grandes similitudes avec le paclitaxel et présente dans les aiguilles de l'arbre. Baptisé docétaxel, cet analogue du paclitaxel est aujourd'hui commercialisé sous le nom de Taxotère. Bien qu'il existe près de 300 composés dans la famille des taxanes, le paclitaxel et docétaxel sont les plus utilisés dans le cadre de la lutte contre certains cancers. En effet, le paclitaxel a été autorisé sur le marché par l'organisme américain FDA (*Food and Drug Administration*) dès 1992 pour le traitement du cancer de l'ovaire et est aujourd'hui utilisé contre les cancers du sein, du poumon et des sarcomes de Kaposi (Rowinsky, 2003; Weaver, 2014).



**Figure 16. Mécanisme d'arrêt du cycle par les MTA.** Les taxanes et épothilones entraînent une hyperstabilisation des microtubules alors que les vinca-alcaloïdes entraînent leur déstabilisation. L'éribuline est utilisée dans le cancer du sein métastatique alors que la colchicine est peu utilisée dans le traitement des cancers. Le nocodazole est principalement utilisé pour la recherche (figure adaptée de (Karahalil, Yardım-Akaydin and Nacak Baytas, 2019)).

D'un point de vue mécanistique, le paclitaxel promeut l'assemblage des microtubules, diminue le pool de monomères de tubuline solubles et empêche la dépolymérisation *in vitro*, même sous l'effet de solution saline froide ou de calcium (figure 16) (Schiff, Fant and Horwitz, 1979). Ces effets décrits *in vitro* ont également été validés *in cellulo* (Schiff and Horwitz, 1980; Milas *et al.*, 1995). L'autre famille de molécules stabilisatrices des microtubules sont les épothilones, des composés naturels extraits au début des années 1990 chez la myxobactérie *Sorangium cellulosum*. Grâce aux expériences de Bollag et collègues, nous savons que les épothilones semblent avoir un site commun de liaison à la tubuline avec le paclitaxel (figure 16) (Bollag *et al.*, 1995). L'effet de stabilisation des microtubules est néanmoins différent de celui du Taxol. En effet, ces molécules semblent avoir une capacité à induire la polymérisation des microtubules plus importante que celle des taxanes. Il a été montré notamment que l'activité des épothilones était 2 à 4 fois supérieure au paclitaxel (Lee *et al.*, 2001) et restaient efficaces dans les lignées cellulaires résistantes au paclitaxel (Giannakakou, Gussio, *et al.*, 2000). Ainsi, leur efficacité antitumorale a été rapportée dans plusieurs cancers tels que ceux touchant la prostate, le sein, le colon ou encore le pancréas (pour revue (Klar, Hoffmann and Giurescu, 2008)). Malgré des effets

prometteurs, plusieurs effets secondaires importants comme une neutropénie, une inflammation des muqueuses ou encore une toxicité périphérique ont été décrits dans des essais cliniques (pour revue (Forli, 2014)).



**Figure 17. Trafic intracellulaire de protéines de réparation de l'ADN par la dynéine.** Plusieurs protéines de réparation de l'ADN sont transportées par la dynéine vers le centrosome. Il est suggéré que leur proximité avec le noyau favorise leur translocation. Le blocage des microtubules par des MTA perturbe ce mécanisme et sensibilise les cellules aux DDA (Giannakakou *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 2005; Poruchynsky *et al.*, 2015) (Created with BioRender.com).

L'effet cytotoxique du paclitaxel suppose un arrêt du cycle cellulaire pendant la mitose. La mort cellulaire qui intervient donc au terme d'un arrêt prolongé, suppose une division active de la cellule. Paradoxalement, beaucoup de cellules tumorales humaines ayant un temps de doublement très faible restent sensibles à ces molécules (Komlodi-Pasztor *et al.*, 2011; Mitchison, 2012). Plusieurs autres éléments peuvent expliquer l'effet bénéfique des taxanes en dehors d'un contexte de division cellulaire. Dans une étude, le traitement de lignée de carcinome pulmonaire (A549) et mammaire (MCF7) par le docétaxel a montré un effet potentialisateur d'agents endommageant l'ADN (doxorubicine). Les auteurs

de l'étude ont montré que le docétaxel entraîne un blocage des microtubules pas seulement pendant l'anaphase mais également pendant l'interphase. En réalisant des fractionnements biochimiques cytosol/noyau, les auteurs trouvèrent que certaines protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que 53BP1, DNA-PKcs ou encore p53 étaient séquestrées dans le cytosol en présence de cette drogue. Cette séquestration explique alors la sensibilité accrue de ces cellules dans de telles conditions de traitements aux drogues induisant des cassures de l'ADN. La plupart des protéines de réparation de l'ADN co-immunoprécipitaient avec la dynéine. Le transport de protéines de réparations telles que p53 et 53BP1 avaient déjà été démontré par d'autres équipes (Giannakakou, Sackett, *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2005). En conclusion, en plus de son rôle dans la perturbation de la ségrégation du matériel génétique pendant la mitose, cette étude a mis en lumière un effet délétère du docétaxel pendant l'interphase (figure 17) (Poruchynsky *et al.*, 2015). Aussi, il a été montré que les taxanes pouvaient agir sur d'autres mécanismes en activant par exemple l'apoptose (Mason *et al.*, 1997), en inhibant l'angiogenèse (Sweeney *et al.*, 2001) ou encore en agissant sur le stress oxydant .

## ii. Les déstabilisateurs des microtubules : les vinca-alcaloïdes

En 1958, Robert Noble et Charles Beer souhaitant étudier l'effet d'extraits de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* anciennement *Vinca rosea*) sur le diabète chez le rat, découvrirent non pas une diminution de la concentration sérique en glucose mais une déplétion des cellules hématopoïétiques (Noble, Beer and Cutts, 1958). Plus tard, en 1960, Johnson et ses collègues trouvèrent que l'effet antitumoral observé provenait d'alcaloïdes présents dans les feuilles de cette espèce : la vincaléukoblastine, aujourd'hui appelée vinblastine. Une autre molécule présente dans chez *C. roseus*, la vincristine, possède des propriétés similaires à la vinblastine. Ces dernières ont en effet montré des effets probants sur la régression tumorale (Johnson *et al.*, 1960). Les vinca-alcaloïdes (VAs) sont au nombre de cinq : la vinblastine (VBL), la vincristine (VCR), la vinorelbine (VRL), la vindesine (VDS) et la récente vinflunine (VFN). Aujourd'hui, ces molécules sont approuvées par la FDA pour le traitement de différentes tumeurs telles que les leucémies, les lymphomes hodgkiniens ou les cancers solides du sein et du poumon. À l'inverse des taxanes qui, en s'y fixant, augmentent la stabilité des microtubules, les molécules de la famille des VAs favorisent leur dépolymérisation d'une manière concentration-dépendante (figure 16). L'action de ces molécules a donc pour conséquence un réseau microtubulaire désordonné et une incapacité des monomères de tubuline de s'assembler entre eux (pour

revue (Martino *et al.*, 2018)). La structure du dimère VBL-tubuline a été déterminée par Gigant et al et qui montre que celle-ci se fixe entre une sous-unité  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$  de la tubuline (Gigant *et al.*, 2005). Les VAs ont en effet des sites de liaison aux microtubules différents de celui des taxanes. Cette déstabilisation des microtubules apportée par les VAs entraîne donc une incapacité des microtubules à fixer les kinétochores et de séparer correctement le matériel génétique pendant l'anaphase (Jordan, Thrower and Wilson, 1991; Ngan *et al.*, 2001).

## b. Les résistances

### i. Isoformes $\beta$ III et mutations de la tubuline

La tubuline regroupe deux sous-unités appelées  $\alpha$  et  $\beta$ . Les taxanes, nous l'avons vu, se lient spécifiquement à la tubuline  $\beta$ . Des mutations de la tubuline  $\beta$  ont été identifiées la première fois en 1997 dans des lignées cellulaires de cancers ovariens (Giannakakou *et al.*, 1997). Depuis, la création de lignées cellulaires résistantes aux paclitaxel ou docétaxel a permis de rapporter des mutations de la tubuline  $\beta$  dans des cellules de la lignée CHO (*Chinese Hamster Ovary*) (Gonzalez-Garay *et al.*, 1999), prostatiques (Hara *et al.*, 2010) ou encore pulmonaire (Monzó *et al.*, 1999). Toutefois, ces résultats de laboratoire ne sont pas forcément pertinents dans un contexte thérapeutique étant donné qu'aucune analyse d'échantillons issus de patients n'a permis d'identifier ce type de mutations chez l'Homme (pour revue (Berrieman, Lind and Cawkwell, 2004)). En plus de mutations de la tubuline, l'isotype  $\beta$ III de la tubuline qui est normalement retrouvée dans les neurones du SNC et dans les cellules de Sertoli, est sur-représentée dans des cellules de cancers ovariens (Kavallaris *et al.*, 1997) et de cancer du poumon non à petites cellules (Gan, Pasquier and Kavallaris, 2007). Chez les patients, la présence de cet isotype a été associée à une agressivité tumorale importante et une résistance aux taxanes et certains VAs comme la vinorelbine (Navelbine) (Sève and Dumontet, 2008). Bien qu'efficace contre les taxanes et VA, la tubuline de classe III ne semble pas impacter la liaison des épothilones à la tubuline. En effet, il a été montré que la présence de cette isoforme dans des lignées résistantes au paclitaxel n'impacte pas la liaison des épothilones sur le microtubule (Magnani *et al.*, 2006). La résistance aux épothilones semble donc moins fréquente que celle des taxanes et VA, ce qui corrèle avec leur potentiel polymérisateur plus important (Giannakakou, Gussio, *et al.*, 2000).



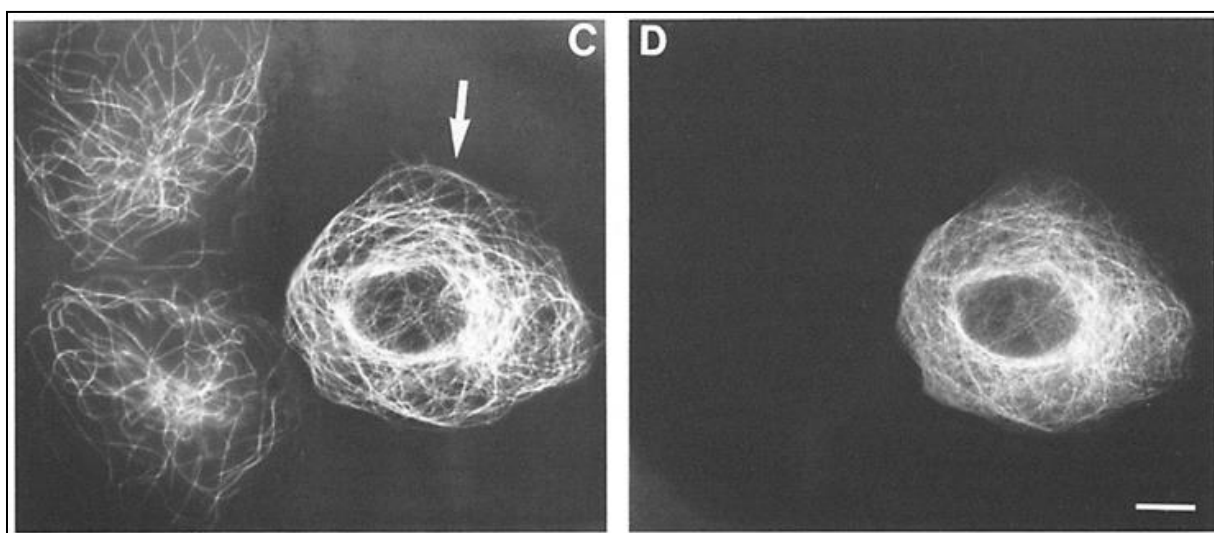
## ii. Présence de protéines associées aux microtubules

### 1. Les protéines MAP2, MAP4 et stathmine

Dans les années 1970, des études de purification des microtubules ont permis de montrer que certaines protéines restaient dans les fractions de microtubules polymérisés (Sloboda, Dentler and Rosenbaum, 1976). En effet, il a été estimé que 60% de ces fractions étaient composées de tubuline et les 40% restants de protéines qui sont associées aux microtubules. Ces MAPs peuvent être regroupées dans au moins 4 familles : les MAPs dites structurales qui fixent le microtubule formé et organise leur structure, les MAPs dites +TIPs (*plus-end-tracking proteins*) qui fixent l'extrémité + des MTs, les protéines de catastrophe qui favorisent le désassemblage des dimères de tubuline et les protéines motiles qui participe au trafic intracellulaire. Certaines protéines MAPs structurales stabilisatrices ont été décrites comme étant impliquées dans la résistance thérapeutique aux MTA. La protéine MAP4 représente la principale MAP non-neuronale. Néanmoins, elle a été retrouvée sur-représentée dans des cellules de la lignée murine de carcinome mammaire C127. Dans ces cellules, la réduction de MAP4 induite par l'augmentation de p53 a été associée à une chute de la viabilité cellulaire après un traitement à la VBL (Zhang *et al.*, 1999). De la même façon, la protéine stathmine codée par le gène *STMN1* est fréquemment surexprimée dans tumeurs hématologiques et solides (Machado-Neto, Saad and Traina, 2014; Mao *et al.*, 2018). D'un point de vue fonctionnel, la stathmine fixe les hétérodimères de tubuline libres (figure 16). Elle intervient donc indirectement dans la déstabilisation du réseau microtubulaire. Dans les cellules de la lignée tumorale mammaire BT-549, il a été démontré que son inhibition par siRNA permet d'accroître la sensibilité de ces cellules à la VBL et au paclitaxel (Alli *et al.*, 2007) et est associée à un pronostic défavorable pour les cancers de l'ovaire (Su *et al.*, 2009). Dans les neurones, la dynamique microtubulaire est régulée par les protéines MAPT (tau) et MAP2. L'augmentation des isoformes MAP2a et MAP2b, qui possèdent une forte affinité pour les microtubules, a été retrouvée dans des cellules de neuroblastomes BE(2)C résistantes à la VCR (Don *et al.*, 2004). Ainsi, les protéines stathmine, MAP2 et MAP4 ont été rapportées dans les cancers comme pouvant être impliquées dans l'altération des effets des médicaments de la famille des taxanes et des VAs. Toutefois, certaines études ont mis en évidence un effet positif de ces MAPs sur l'efficacité des traitements MTA (Bauer *et al.*, 2010 ; Devred *et al.*, 2008) et ont été principalement étudiées dans un contexte *in cellulo*. En revanche, chez le patient, la résistance thérapeutique aux taxanes a pu être expliquée par la présence de la principale MAP neuronale : la protéine tau.

## 2. La protéine tau et la résistance aux taxanes

La majorité de ces études citent les travaux de Rouzier et collègues publiés en 2005 (Rouzier *et al.*, 2005) comme étant la première évidence d'un rôle de tau dans la résistance thérapeutique face à ces composés (Mimori *et al.*, 2006; Smoter *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Bonneau *et al.*, 2015). Bien que cette étude ait été la pionnière dans l'introduction de tau dans la résistance thérapeutique des cancers, elle n'est pas la première à avoir mis en évidence une relation tau-MTA. En 1986, Drubin et Kirschner, en souhaitant confirmer l'effet de tau sur la polymérisation des microtubules, démontrèrent un effet de résistance face à un agent ciblant les microtubules. En utilisant de fortes concentrations de nocodazole (33  $\mu$ M) pour induire une déstabilisation des microtubules, les auteurs remarquèrent que la microinjection de 2 mg/ml de protéine tau (figure 18, cellule fléchée) empêchait ou ralentissait le processus de dépolymérisation induit par le nocodazole alors que les cellules dépourvues de tau affichaient un réseau microtubulaire déstabilisé (figure 18). Ils conclurent à un rôle de tau dans la polymérisation des monomères de tubuline et la stabilisation des microtubules formés (Drubin and Kirschner, 1986). Néanmoins, en remettant ces résultats en perspective des connaissances actuelles, cette étude permit également d'établir un effet de la protéine tau sur l'efficacité d'une drogue ciblant les microtubules.



**Figure 18. Première évidence d'un effet compétiteur de tau avec un agent ciblant les microtubules.** Des cellules RAT1 de fibroblastes sont traitées 1 min avec 33  $\mu$ M de nocodazole C) Immunomarquage par un anticorps couplé à la rhodamine de la tubuline. La flèche correspond à la cellule RAT1 de fibroblaste microinjectée avec 2 mg/ml de protéine tau. D) Immunomarquage par un anticorps couplé à la fluorescéine de la

protéine tau. La cellule fléchée est microinjectée avec 2 mg/ml de protéine tau et présente un réseau microtubulaire stable en comparaison avec les cellules adjacente non-microinjectée dont les microtubules sont déstabilisés (Drubin and Kirschner, 1986).

Près de vingt ans plus tard, Rouzier et collègues collectèrent des échantillons de tumeurs mammaires de 122 patients traités pendant 24 semaines au paclitaxel et aux anthracyclines. Parce que certaines études estimèrent à 40% le haut risque de récurrence des cancers du sein malgré les traitements (Megerdichian, Olimpiadi and Hurvitz, 2014), les auteurs tentèrent de caractériser les gènes qui interfèrent avec les chimiothérapies contenant du paclitaxel. Par une technique de microarray, l'étude révéla que 74% des patients ayant présenté une réponse pathologique complète (pCR, *pathological Complete Response*) avaient de très faibles quantités de tau. Ces résultats furent alors confirmés par des marquages immunohistochimiques de tau dans les tissus de ces patients dont les tumeurs avaient été persistantes. Les auteurs conclurent alors que la protéine tau était probablement le meilleur indicateur pour prédire la réponse d'une tumeur au paclitaxel. Ils expliquèrent cet effet par une compétition entre la protéine tau et ce composé appartenant à la famille des taxanes. La diminution d'expression de tau par une approche de siRNA permis aux auteurs de montrer que la modulation de son expression dans différentes lignées cellulaires de cancers mammaires permettait de les résensibiliser aux taxanes. Cette résistance thérapeutique est donc spécifique de l'expression de *MAPT* (Rouzier *et al.*, 2005). Effectivement, plusieurs études s'intéressant à la nature de l'interaction entre la protéine tau et le microtubule ont montré que sa liaison pouvait se faire entre les hétérodimères de tubuline, tout au long du microtubule et au niveau de la face interne ou externe (Kar *et al.*, 2003; Santarella *et al.*, 2004; Kadavath, Jaremkov, *et al.*, 2015; Martinho *et al.*, 2018). Les auteurs de l'étude de Rouzier expliquent qu'en présence de tau, le paclitaxel est moins susceptible de fixer le microtubule et d'induire une hyperpolymérisation (Rouzier *et al.*, 2005).

Depuis, une quantité croissante de travaux s'est intéressée à l'effet compétiteur de la protéine tau et des taxanes. La même équipe a montré deux ans plus tard que de faibles quantités d'ARNm de *MAPT* était retrouvé chez les patients ayant eu une pCR à une chimiothérapie à base de paclitaxel/5-fluorouracil/doxorubicine/cyclophosphamide (paclitaxel/FAC) (Andre *et al.*, 2007). La même corrélation a été établie par Mimori et collègues. Dans leur étude, 86% des patients ayant un cancer gastrique tau positif restaient insensibles au paclitaxel alors que 100% des cancers tau négatifs avaient une réponse favorable à la chimiothérapie (Mimori *et al.*, 2006). Dans ces études, la diminution

d'expression de *MAPT* par une approche de siRNA augmentait la sensibilité des cellules cancéreuses au paclitaxel démontrant ainsi le rôle exclusif de tau dans cette résistance thérapeutique. Wang et al confirmèrent que de faibles quantité de tau dans les cancers gastriques répondaient beaucoup plus favorablement à des traitements au paclitaxel (Wang *et al.*, 2013). Les cancers du sein et de l'appareil digestif ne sont pas les seuls concernés par cet effet de tau sur les taxanes. Dans une étude menée en 2013 par Smoter et ses collaborateurs, l'expression de *MAPT* a été retrouvée dans plusieurs cancers de l'ovaire. Sur un total de 74 patientes, la protéine tau était retrouvée chez 74,3% d'entre elles. À l'instar des études précédentes, le but ici était de déterminer la valeur prédictive de tau en réponse à une chimiothérapie à base de sels de platine et de paclitaxel. Comme attendu par l'équipe de recherche, la survie globale (OS, *Overall Survival*) était significativement plus faibles pour les cancers tau positifs (Smoter *et al.*, 2013). De manière intéressante, la surexpression du long ARN non codant lncRNA *MAPT-AS1*, le régulateur négatif de l'expression de *MAPT*, a été associée à un meilleur pronostic pour les patientes atteintes de cancers mammaires (Wang *et al.*, 2019). En plus de ce lncRNA, des microARN ont également montré des effets de résistance aux taxanes par un mécanisme dépendant de tau. Les miRNA miR-34c-5p et miR-186 ont été associés à une modulation de la résistance au paclitaxel dans les cancers gastriques et bronchiques non à petites cellules (NSCLC, *Non-Small Cell Lung Cancer*) en modulant l'expression de *MAPT* (Wu *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2016). Dans leur étude, Cai et collègue ont mis en évidence une modulation d'expression des miR-362-3p, miR766-3p, miR-6507-3p dans la lignée de NSCLC chimiorésistante H460\_TaxR. Ces différences d'expression de miRNAs entre H460 et H460\_TaxR est associée à une augmentation d'expression de *MAPT* (Cai *et al.*, 2019).

En plus des taxanes, les épothilones constitue un traitement qui a montré un bonne efficacité chez les patients et sur des modèles cellulaires résistants au paclitaxel (Nicolaou, Roschangar and Vourloumis, 1998; Giannakakou, Gussio, *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Dans une étude de phase II qui cherchait à définir l'efficacité et la dose d'administration de l'ixabepilone, un épothilone utilisé en chimiothérapie néoadjuvante, les auteurs ont alors identifié le récepteur ER et l'ARNm de *MAPT* comme ayant la meilleure valeur prédictive en réponse au traitement (Baselga *et al.*, 2009). Cette corrélation est expliquée par la capacité de tau à lier les microtubules. Tau pourrait donc s'avérer être un marqueur de l'efficacité des épothilones. Cependant, l'étude de Fountzilias et al a démontré un effet opposé de tau dans la sensibilité à l'ixabepilone (Fountzilias *et al.*, 2013). Dans la discussion de cette dernière étude, les auteurs expliquent tout de même que leurs résultats sont en contradiction avec les effets de tau décrits dans la littérature sur les MTAs. Ils expliquent alors que le sous-type tumoral, le type de traitement et la

taille des échantillons peuvent expliquer ces différences. Des études plus approfondies restent néanmoins nécessaires.

### 3. Les thérapies endommageant l'ADN

Bien que l'ADN soit le socle de l'information génétique, sa structure labile en fait une cible pour diverses menaces endogènes ou exogènes. Des mutations apparaissent en effet quotidiennement dans chacune de nos cellules dont le nombre est estimé à environ 70 000 par jour. Ces dommages peuvent apparaître spontanément notamment lors de la réplication de l'ADN ou par des modifications intrinsèques des bases lors de processus telles que la désamination spontanée ou être apportées par différents éléments chimiques, physiques ou biologiques (pour revue (Tubbs and Nussenzweig, 2017)). Nous pouvons alors classer ces sources de dommages en deux catégories : les facteurs endogènes et les facteurs exogènes. Au sein de ces deux catégories, plusieurs sous-catégories peuvent être identifiées. Une proposition de classification est représentée dans la table ci-dessous (table 1).

Catégorie	Interne		Externe	
Sous-catégorie	<i>Stress cellulaires</i>	<i>Autres</i>	<i>Naturelle</i>	<i>Thérapeutique</i>
Source	Stress oxydant, stress réplicatif	Dommages récurrents/spontanés de l'ADN	Alimentation, UV, perturbateurs endocriniens, agents infectieux, tabac, alcool, drogues	Radiothérapie, agents alkylants, antimétabolites, inhibiteurs de topoisomérase, antibiotiques

**Table 1. Catégories de sources d'endommagement de l'ADN.** Les sources d'endommagement de l'ADN peuvent être endogènes ou exogènes. Adapté de (Tubbs and Nussenzweig, 2017)

L'endommagement de l'ADN constitue donc l'une des premières causes de la sénescence, de l'apoptose ou de la carcinogenèse pour une cellule (Carusillo and Mussolino, 2020). Dans ce dernier cas, une forte instabilité génomique va provoquer un taux de mutations plus élevé permettant l'expression d'oncogènes ou la répression de gènes suppresseurs de tumeurs. Bien que cette instabilité génomique soit favorable à la progression tumorale, elle constitue également son talon d'Achille. En effet, cette instabilité rend la cellule cancéreuse plus sensible aux facteurs endommageant l'ADN. Ainsi, des

éléments physiques comme les rayons X en radiothérapie ou chimiques comme différentes molécules (table 1) en chimiothérapie sont considérablement utilisés dans le traitement d'un cancer. Ces thérapies sont diverses et variées et induisent différents types de dommages.

a. Les chimiothérapies à base de DDA

i. Les antimétabolites

Par définition, les antimétabolites perturbent le métabolisme cellulaire et induisent des dommages. En chimiothérapie, ils induisent des dommages à l'ADN en visant sa réplication. Le 5-fluorouracil (5-FU), du groupe des analogues de la pyrimidine, est la première molécule synthétisée au siècle dernier et aujourd'hui utilisée abondamment dans le traitement de certains cancers comme l'adénocarcinome colorectal. Une fois métabolisé par la cellule en 5-FdUMP (5-fluorodésoxyuracile monophosphate), il bloque sélectivement l'activité de la thymidylate synthase (TS) qui limite la formation de thymidine 5'-triphosphate (dTTP). Ceci a pour conséquence des erreurs de réplication, une accumulation de dommages à l'ADN, un arrêt du cycle en phase S et, à termes, conduit la cellule à entrer en apoptose (figure 19) (Maybaum *et al.*, 1980). Des analogues du 5-FU, comme de la floxuridine (5-fluoro-2'-désoxyuridine, 5-FdU) ou la capécitabine (Xeloda) sont utilisés dans le traitement du cancer du côlon et cancers du sein métastatiques résistants aux anthracyclines taxanes (Pallis *et al.*, 2012).

Le 5-FU fait partie de la famille des analogues des bases pyrimidiques. Il existe également des analogues des bases puriques. C'est le cas notamment de la 6-mercaptopurine (6-MP) et de la 6-thioguanine (6-TG). À l'instar du 5-FU, les analogues de la purine sont métabolisés dans la cellule et interfèrent avec la formation du brin d'ADN néosynthétisé (Inamochi *et al.*, 1999). La 6-TG est par exemple incorporée dans les acides nucléiques par la protéine hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) (Elion, 1989). Une fois incorporée à l'ADN, la 6-TG peut être méthylée par la S-adénosylméthionine, formant le substrat S6-méthylthioguanine et qui, par mésappariement avec la thymine et cytosine conduit à une accumulation de dommages à l'ADN, un arrêt prolongé du cycle cellulaire en phase G2 et à l'apoptose et l'autophagie (Yan *et al.*, 2003; Yamane, Taylor and Kinsella, 2004). De plus, la 6-TG peut également induire un stress oxydant (Chaabane and Appell, 2016). La 6-thioguanine est utilisée dans le cadre des leucémies aiguës lymphoïdes de l'enfant (Gehan and Freireich, 2011; L. Chen *et al.*, 2020).

D'autres types d'antimétabolites comme le méthotrexate (MTX) faisant partie du groupe des antifolates, les plus anciennes molécules de la famille des antimétabolites. Étant un antagoniste de l'acide folique, le MTX fixe la dihydrofolate réductase et inhibe son activité empêchant ainsi la biosynthèse du tétrahydrofolate. Ce mécanisme induit donc une carence en bases puriques et altère la réplication. De nos jours, le MTX et d'autres antifolates sont utilisés ou en essai clinique pour le traitement des cancers hématologiques, cérébral, mammaire ou encore des sarcomes (Koźmiński *et al.*, 2020). Dans certaines chimiothérapies, l'hydroxyurée peut être utilisée. Cette molécule également appelée hydroxycarbamide réduit l'activité de la ribonucléotide réductase et diminue ainsi le pool de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP). Elle est principalement utilisée dans le traitement de certains mélanomes et tumeurs cérébrales (Madaan, Kaushik and Verma, 2012).

Ainsi, il existe une grande diversité d'antimétabolites agissant sur différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques et administrés dans le cas de plusieurs types de cancers. Leur mode d'action repose principalement sur l'altération du métabolisme des acides nucléiques créant ainsi des défauts de réplication de l'ADN et une accumulation de dommages simple et double brin.

## ii. Les agents alkylants

Historiquement, la découverte des effets antitumoraux des composés de la famille des agents alkylants remonte à la deuxième guerre mondiale. Des autopsies de soldats de la première guerre mondiale victimes de gaz moutarde montrèrent une hypoplasie lymphoïde et une myélosuppression. Ainsi, en 1942, Alfred Gilman et Louis Goodman menèrent des expériences sur souris porteuses de tumeurs lymphoïdes transplantées et découvrirent une régression tumorale importante lorsque celles-ci étaient traitées avec un composé azoté identique à ceux retrouvés dans les armes chimiques. Les expériences qui suivirent permirent de montrer que la moutarde azotée administrée à un patient atteint d'un lymphome non-Hodgkinien entraîna une rémission (Gilman and Philips, 1946; Gilman, 1963; Chabner and Roberts, 2005).

Le mode de fonctionnement des agents alkylants repose sur l'ajout d'un groupement alkyle sur la guanine créant des mésappariements et un endommagement de l'ADN. Ces dommages peuvent apparaître par trois mécanismes : (1) un cross-link entre deux guanines empêche la séparation des deux monobrins pendant la réplication, (2) l'alkylation induit des mésappariements qui génèrent directement

une cassure de l'ADN ou (3) indirectement par la prise en charge de protéines de réparation (figure 19). Les agents alkylants peuvent être classés dans au moins six différents groupes : (1) les alkyles-sulfonates (busulfan), (2) les éthylène-imines and méthyles-mélatamines (hexaméthylmélatamine ou altrétamine), (3) les moutardes azotées (cyclophosphamide, chlorméthine, ifosfamide ou encore melphalan), (4) les triazènes (dacarbazine et témozolomide), (5) les pipérazines et enfin (6) les nitrosurées (carmustine et streptozocine).

Les moutardes azotées sont un groupe d'agents alkylants dont le cross-link créé intervient entre deux positions O6 ou N7 des guanosines monophosphates de brins complémentaires (Price *et al.*, 1968; Dong *et al.*, 1995). Ainsi, la principale lésion créée par ces molécules est la O<sup>6</sup>-alkylguanine (pour revue (Margison and Santibáñez-Koref, 2002)). Malgré la synthèse de centaines de moutardes azotées, seules quelques molécules sont actuellement utilisées dans le traitement des cancers. Ainsi, la chlorméthine (ou méchloréthamine, la molécule utilisée par Gilman et Goodman), la cyclophosphamide, le melphalan, le chlorambucil et l'ifosfamide sont aujourd'hui couramment utilisés dans le traitement des cancers des testicules (Loehrer *et al.*, 1988), des ovaires (Young *et al.*, 1990), du sein (Rivkin *et al.*, 1989) ou encore du myélome (Barlogie *et al.*, 1990). En plus des molécules de la famille des moutardes azotées, les nitrosurées telles que la carmustine sont utilisées dans le traitement des gliomes (Walker *et al.*, 1978) et des myélomes (Presant and Klahr, 1978). Les sels de platines comme le cisplatine ou l'oxaliplatine génèrent également des cross-link entre les bases puriques de l'ADN. Le mécanisme d'action du cisplatine repose sur une liaison des purines sur leur azote N7 créant des cross-link et induisant des dommages à l'ADN dans les cancers du poumon, de l'ovaire et du sein (Dasari and Tchounwou, 2014). Des études récentes ont montré que les agents alkylants étaient générateurs de CDB de l'ADN en induisant un arrêt prolongé des fourches de réplication pendant la phase S (Kondo *et al.*, 2009; Roos *et al.*, 2009; Quiros, Roos and Kaina, 2010).

### iii. Les inhibiteurs de topoisomérase

Les topoisomérases sont des enzymes capables de modifier l'enroulement de la double hélice en hydrolysant le ou les brins d'ADN générant une cassure essentielle dans les processus de réplication et de transcription. Il existe la topoisomérase de type I appelée communément l'ADN topoisomérase et celle de type II appelée ADN gyrase. Alors que la topoisomérase de type I génère des cassures simple brin (CSB) transitoires, la topoisomérase II induit des CDB transitoires (pour revue (Wang, 2002)).



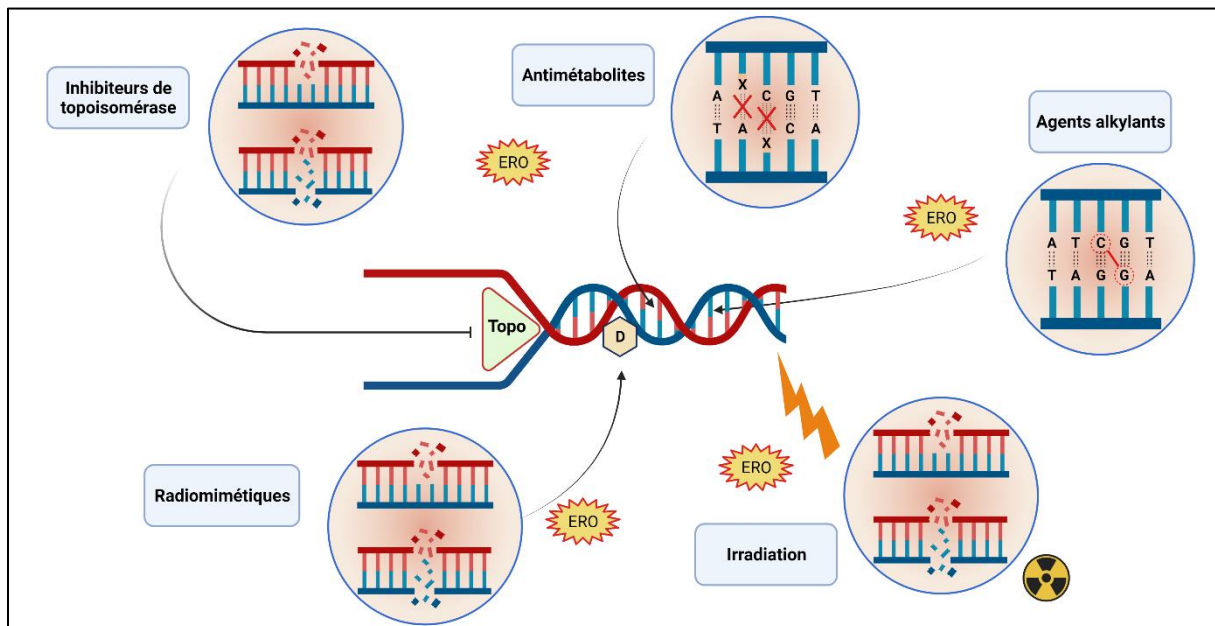
Cette dernière clive les liaisons phosphodiester des deux brins d'ADN, générant donc une CDB dans un segment nommé G (*gated*) pour y faire passer un autre segment T (*transported*). De ce fait, la topoisomérase II est une cible de choix contre les cellules très prolifératives. Ses inhibiteurs permettent en effet une accumulation importante de dommages à l'ADN une efficacité contre plusieurs types de cancers (figure 19).

Les inhibiteurs de topoisomérase peuvent être classés dans deux groupes en fonction de leur mécanisme d'action. Ainsi, l'étoposide, la doxorubicine, la daunorubicine et le mitoxantrone, souvent retrouvés sous le nom de « poisons topo II » (en anglais, « *topo II poisons* ») agissent sur le complexe topoisomérase II-ADN en le stabilisant et maintenant ainsi la double cassure, empêche la réplication ou la transcription d'être réalisée et entraîne, à termes, la mort cellulaire (pour revues (Fortune and Osheroff, 2000; Pommier *et al.*, 2010)). Le second groupe connu sous le nom de « médicaments ciblant la topo II » (en anglais, *topo II-targeting drugs*) regroupe principalement les inhibiteurs du cycle catalytique de l'enzyme. Ces molécules empêchent simplement la topoisomérase II de réaliser une CDB, par compétition avec l'ATP ou prévention de son hydrolyse, et ne génèrent donc pas de dommages à l'ADN. Elles sont plutôt utilisées en clinique comme cardioprotecteurs ou potentiateurs d'autres composés comme la doxorubicine par exemple (Larsen, Escargueil and Skladanowski, 2003; Skok *et al.*, 2020).

La doxorubicine (également appelée hydroxydaunorubicine ou Adriamycine) est une molécule de la famille des anthracyclines utilisée en routine dans plusieurs types de cancers incluant le sein, les ovaires, les poumons, les lymphomes Hodgkiniens et non-Hodgkiniens ou encore les myélomes et sarcomes (pour revue (Cortés-Funes and Coronado, 2007)). Elle a été synthétisée à partir de la daunorubicine, une molécule découverte dans l'espèce bactérienne *S. peucetius* de la famille des Streptomyces (Arcamone *et al.*, 1969). En tant que poison de la topoisomérase II, son principal mécanisme d'action repose sur l'altération de cette enzyme et la génération de CDB de l'ADN (Tewey *et al.*, 1984). Un autre mécanisme qui lui a rapidement été imputé est la génération de radicaux libres et la genèse d'un stress oxydant. La formation de la doxorubicine-semiquinone peut altérer directement la mitochondrie en agissant sur la chaîne respiratoire mitochondriale (Davies and Doroshow, 1986; Doroshow and Davies, 1986) ou en perturbant les flux calciques (Solem, Henry and Wallace, 1994) et induisant une formation de stress oxydant. Malgré des effets secondaires notoires telles qu'une cardiotoxicité, la doxorubicine est un traitement de choix, efficace dans plusieurs cancers.

#### iv. Les radiomimétiques

Il existe des molécules qui induisent des CDB de l'ADN en intervenant directement sur sa séquence. En raison de leur effet similaire aux radiations qui génèrent directement des CDB, ces molécules sont appelées « radiomimétiques » dont la plus connue est la bléomycine (figure 19). Cette molécule est un peptide isolé de la bactérie *Streptomyces verticillus* et est utilisée notamment dans certains lymphomes et cancer testiculaires (Bennett and Reich, 1979). Les effets toxiques qu'elle apporte à l'ADN sont tellement similaires à ceux des radiations que la NASA a publié des travaux proposant d'utiliser ce composé pour mimer les effets des rayonnements ionisants spatiaux sur l'Homme (Lu, 2017). L'antibiotique C-1027, un autre radiomimétique de la famille des énédyines, agit de manière quasiment identique et induit directement des CDB qui permettent l'activation des protéines ATM, ATR, p53, Chk1/2 et DNA-PKcs (Liu *et al.*, 2001; Kennedy and Beerman, 2006). Les sels de platines comme le cisplatine ou l'oxaliplatine et les anthracyclines comme la doxorubicine et daunorubicine sont parfois considérés dans la littérature comme étant également des radiomimétiques dans leur mécanisme d'action (Barot, Laverick and Nias, 1985; J. H. Lee *et al.*, 2013).



**Figure 19. Les thérapies endommagement l'ADN.** Les différentes molécules utilisées en chimiothérapie peuvent générer différents types de dommages. Les antimétabolites et agents alkylants induisent principalement des modifications de bases et mésappariements alors que les inhibiteurs de topoisomérase et radiomimétiques

induisent des CDB et un arrêt des fourches de réplication. À termes, les dommages du simple brin dégènèrent en CDB. La radiothérapie induit directement des CSB et CDB de l'ADN. En plus de leurs mécanismes d'action directes, ces différentes thérapies accentuent l'instabilité génomique en induisant un stress oxydant (Created with BioRender.com).

L'endommagement de l'ADN est particulièrement recherché dans le traitement d'un cancer. En effet, lors de la phase S du cycle cellulaire, l'arrivée des fourches de réplication sur une matrice endommagée compromet fortement la survie de la cellule. Les chimiothérapies à base de DDA ont montré leur efficacité ces dernières décennies et sont alors utilisés dans le traitement de plusieurs types de tumeurs solides. Seulement, l'utilisation de la chimie n'est pas la seule à produire de tels effets. En effet, depuis l'essor de la physique moderne et la découverte des rayons X par Röntgen à la fin du XIXe siècle, une autre approche thérapeutique utilisant la physique des particules et des rayonnements a vu le jour.

#### b. La radiothérapie à base de rayonnements ionisants

Un rayonnement est dit ionisant lorsqu'il a la capacité d'arracher des électrons à la matière. Il existe des rayonnements ionisants dits particuliers provenant de la désintégration de noyaux instables générant des rayonnements  $\alpha$  (noyau d'hélium) et  $\beta$  (électrons  $\beta^+$  ou antiélectrons  $\beta^-$ ) mais aussi des rayonnements dits électromagnétiques et qui comprennent les rayons  $\gamma$  et les rayons X. Les rayonnements  $\gamma$  peuvent être obtenus par la désintégration de  $^{137}\text{Césium}$  ou de  $^{60}\text{Cobalt}$  et les rayons X qui sont aujourd'hui obtenu par des LINAC. La radiothérapie consiste en l'application d'un rayonnement ionisant électromagnétique qui vise à endommager les structures cellulaires et macromolécules biologiques dans une perspective thérapeutique. La première utilisation d'une thérapie à base de rayonnements date de 1901 pour le traitement d'un lupus érythémateux avec une source de radium. Les années qui suivirent virent l'utilisation d'éléments radioactifs utilisés chez des patients atteints de différents types de cancers. Dans les années 1940 vint l'avènement des LINAC présentant l'avantage d'éviter des expositions collatérales grâce à rayonnement ciblé et dont l'émission s'arrête en même temps que l'extinction de la source. C'est en 1953 que le premier LINAC est utilisé à l'hôpital Hammersmith de Londres pour le traitement d'un patient atteint d'un cancer solide (pour revue (Gupta, 1995; Thwaites and Tuohy, 2006)). Aujourd'hui, il est estimé qu'environ 50% des cancers existants sont traités par radiothérapie en

complément de la chirurgie et/ou de la chimiothérapie (pour revue (Delaney *et al.*, 2005; Allen, Her and Jaffray, 2017)).

Les rayonnements ionisants utilisés lors d'une séance de radiothérapie ont pour but d'induire dans la zone concernée une dégénérescence cellulaire. En effet, l'irradiation peut déclencher l'apoptose, la nécrose et la sénescence et permet donc la réduction d'une masse tumorale. Ces effets sont apportés par différents mécanismes. Bien que la radiothérapie induise une toxicité dans plusieurs compartiments cellulaires, le plus décrit dans la littérature est son effet dans le noyau et en particulier sur le double brin d'ADN. En effet, pendant l'avènement des machines émettrices de rayonnements ionisants, une étude publia pour la première fois des effets toxiques des rayons X sur l'ADN (Scholes, Stein and Weiss, 1949). Depuis, un nombre considérable d'étude a montré que les rayonnements ionisants ont un effet direct sur la séquence d'ADN et provoquent des CSB, cross-links, mésappariements et CDB. Ces dommages sont obtenus par le « bombardement » direct des électrons produits par le faisceau sur l'ADN (Chen *et al.*, 1998; Collis *et al.*, 2004; Lacombe, Le Sech and Esaulov, 2004; Hunniford *et al.*, 2007; Sharma, Swarts and Bernhard, 2011; Thopan *et al.*, 2017). En plus de provoquer des lésions de l'ADN, les rayonnements ionisants altèrent également certains organites tels que le réticulum endoplasmique (RE) (Pang *et al.*, 2013) et la mitochondrie (Pearce *et al.*, 2001; Barjaktarovic *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2017), participant en plus à la cytotoxicité. De ce fait, ils sont aussi responsables de la formation d'un stress oxydant cellulaire exacerbant l'accumulation de dommages à l'ADN. L'utilisation des rayonnements ionisants en radiothérapie s'est imposée au fil des années pour le traitement des cancers du sein, de l'ovaire, de la prostate, de la peau, des poumons ou encore des voies aéro-digestives (pour revue (Baskar *et al.*, 2012)).

La chimiothérapie à base de DDA et radiothérapie ont démontré des effets positifs importants pour les patients atteints de plusieurs types de cancers. Toutefois, l'efficacité de ces traitements reste relative dans la mesure où certains cancers affichent une résistance.

### c. La résistance à l'endommagement de l'ADN : mécanismes de réparation des CDB

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, il existe plusieurs types d'endommagement de l'ADN : la modification ou le mésappariement de bases, les insertions et délétions ou les CSB et CDB. En fonction du traitement utilisé et du dommage induit, il pourra y avoir différents mécanismes de

résistance généraux, décrits au début de cette partie, ou adaptés. Effectivement, l'efficacité de ces traitements repose sur l'induction de dommages à l'ADN. La résistance face à ces traitements est dans la plupart des cas dus à une réparation de ces dommages induits. Il existe en effet plusieurs des mécanismes de réparations des dommages ponctuels et CSB ainsi que des réparations spécifiques des CDB.

#### i. Généralités sur la réparation des cassures de l'ADN

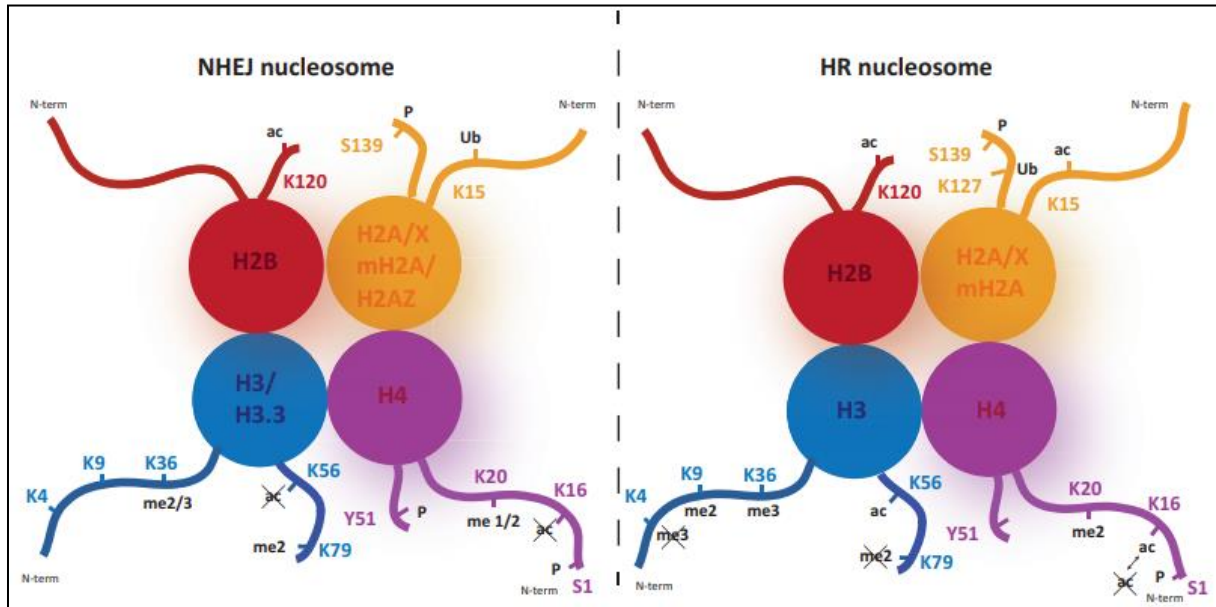
L'endommagement de l'ADN entraîne l'activation d'une cascade de signalisation nucléaire appelée voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR, *DNA Damage Response*). Celle-ci comprend l'arrêt du cycle cellulaire et le recrutement de protéines promptes à initier la réparation du dommage. En fonction du dommage, plusieurs voies de réparation seront mises en place. Pour les modifications de bases et mésappariements, les réparations de type excision de bases (BER, *Base Excision Repair*), excision de nucléotides (NER, *Nucleotide Excision Repair*) ou la réparation des mésappariements (MMR, *Mismatch Repair*) permettront à la cellule de réparer le dommage et réactiver le cycle (pour revue (Zhang, Rohde and Wu, 2009)). Les molécules de chimiothérapie induisant des dommages à l'ADN ainsi que les rayonnements ionisants en radiothérapie peuvent générer ce type de dommages et enclencher, entres autres, ce type de réparation. Dans les cellules cancéreuses, la BER et la NER peuvent être associés à une résistance thérapeutique relative contre différents traitements (pour revues (Adhikari *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2020)). Néanmoins, les CDB restent le type de dommage le plus toxique pour une cellule et sont responsables de l'efficacité de ces traitements. En parallèle, les mécanismes de réparation des CDB sont les facteurs de résistance les plus importants pour ce type de traitement et constituent le plus grand défi en cancérologie. Seules les réparations des CDB comme facteurs de résistance à la chimiothérapie et radiothérapie seront donc développés ici.

Il existe plusieurs mécanismes de réparation des CDB. Parmi eux, certains nécessitent une homologie de séquence et sont appelés HDR (*homology-directed repair*) quand d'autres n'en n'utilisent pas et sont appelés EJ (*end-joining*). La réparation de type EJ comprend la jonction des extrémités non-homologues canonique ou c-NHEJ (en anglais, *canonical non-homologous end joining*) ainsi que la jonction des extrémités non-homologue alternative ou a-NHEJ (en anglais, *alternative non-homologous end joining*). Les réparations de type HDR comprennent la recombinaison homologue ou HR (en anglais, *homologous recombination*) et la SSA (en anglais, *single-strand annealing*). Les gènes impliqués dans les réparations

de type a-NHEJ et SSA, généralement décrites comme générant de l'instabilité génomique, sont surexprimés dans les cancers déficients en mécanismes de réparation HR (mutations des gènes *BRCA1/2*) et conditionnent alors à leur survie. Ces voies ne seront cependant pas décrites dans ce manuscrit. Seules seront développées ici les réparations de type NHEJ et HR. Dans la suite de ce manuscrit, le terme « NHEJ » réfèrera à la c-NHEJ. Il sera précisé lorsque nous aurons à faire à la réparation de type a-NHEJ.

Bien que l'ADN génomique soit toujours imbriqué dans un paysage chromatinien varié, ces modèles de réparation sont souvent considérés uniquement pour de l'ADN nu. Le rôle de l'organisation locale de la chromatine est pourtant primordial dans le recrutement de différents effecteurs protéiques pour réaliser la réparation du double brin. D'un point de vue structurel, Burgess et ses collaborateurs ont montré que l'induction d'une CDB par irradiation entraîne dans un premier temps une relaxation très rapide de la chromatine immédiatement suivie par une recompaction locale. Les auteurs ont établi que celle-ci était essentielle pour l'activation complète de la DDR et sans qui, la réparation n'a pas lieu et la survie des cellules est compromise. En revanche, cet état de compaction est transitoire puisque la réparation totale des brins lésés supposent une nouvelle relaxation à la fin du processus de DDR (Burgess *et al.*, 2014). Cette modification structurelle de la chromatine met évidemment en jeu des modifications d'histones. La mieux caractérisée est la phosphorylation du variant d'histone H2AX sur la sérine 139 (phospho-H2AX Ser139 ou  $\gamma$ H2AX) par des kinases telles que ATM, ATR et DNA-PK. Ce variant d'histone phosphorylé sert de plateforme de recrutement pour diverses protéines comme MDC1 qui va étendre l'activation d'ATM et la phosphorylation de H2AX sur plusieurs kilobases autour de la CDB (Rogakou *et al.*, 1999; Stiff *et al.*, 2004). En plus de H2AX, d'autres histones sont également modifiées. Par exemple, l'acétylation de l'histone H4 par la protéine Tip60 permet de restreindre d'autres modifications post-traductionnelles d'histones alentours afin d'organiser localement la chromatine et de la préparer à la réparation sous-jacente (Murr *et al.*, 2006). Une étude de 2018, qui a examiné plusieurs caractéristiques de la chromatine dans un contexte d'induction de CDB, a révélé dans des cellules de la lignée U2OS une perte de l'histone H1 sur plusieurs mégabases de part et d'autre de la CDB. De manière intéressante, les auteurs ont également trouvé que l'histone H2B subissait une transition entre une monoubiquitinylation et une acétylation sur sa lysine 120, spécifiquement pour la NHEJ (Clouaire *et al.*, 2018). En effet, certaines modifications d'histones seront spécifiques de la NHEJ alors que d'autres le seront pour la HR (figure 20) (pour revue (Clouaire and Legube, 2019)). L'activation de la voie DDR

et le déclenchement de la NHEJ ou de la HR nécessitent donc un remodelage local et étendu de la chromatine spécifique à chacune de ces deux voies de réparation.



**Figure 20. Le nucléosome de la NHEJ et de la HR.** Les stades précoces de la réparation des CDB sont caractérisés par une réorganisation de la chromatine. Des acétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitinylation bien spécifiques des histones dans les nucléosomes permet le recrutement d'effecteurs protéiques impliqués dans la NHEJ ou la HR (figure de (Clouaire and Legube, 2019))

Ces modifications chromatiniennes vont également servir de plateforme de recrutement à certaines protéines initiatrices de la voie DDR. En effet, au niveau du site lésé, deux protéines vont agir de manière antagoniste. Généralement, si la protéine BRCA1 est recrutée, la cellule en phase S ou G2 va favoriser la HR alors que si c'est la protéine 53BP1 qui est présente, la cellule privilégiera la NHEJ. Alors que 53BP1 inhibe la resection d'un des deux brins lésés nécessaire à la HR pendant la phase G1 (Bothmer *et al.*, 2010), BRCA1 inhibe 53BP1 en phase S afin d'inhiber la NHEJ pendant la réplication d'ADN (Bunting *et al.*, 2010). Toutefois, l'activité de BRCA1 peut également limiter le déclenchement de la HR. En stabilisant la protéine Ku80 au sites lésés, Jiang et collègues ont montré que BRCA1 pouvait être favorable à la NHEJ spécifiquement pendant la phase G1 du cycle cellulaire (Jiang *et al.*, 2013). Aussi, à travers un complexe avec la protéine RAP80, il a été montré que BRCA1 pouvait restreindre la resection du brin lésé par CtIP dans les phases S/G2 du cycle cellulaire (Coleman and Greenberg, 2011).

L'ubiquitinylation de l'histone H2A servant de plateforme pour la protéine RAP80 est essentielle dans le recrutement de BRCA1 au niveau de la CDB (Wang *et al.*, 2007). La présence de la protéine HP1, notamment au niveau de la marque H3K9me2, semble également être importante pour le recrutement de BRCA1 (Y.-H. Lee *et al.*, 2013). Le modèle de recrutement de 53BP1 au site de la CDB suppose, lui, une interaction avec MDC1 et la marque H4K20me2 (Botuyan *et al.*, 2006; Eliezer *et al.*, 2009). Une autre étude a montré que 53BP1 pouvait reconnaître et lier l'histone H2A ubiquitinylée sur la lysine 15 par RNF168, une marque spécifique de la NHEJ (figure Nucléosome NHEJ) (Fradet-Turcotte *et al.*, 2013).

En conclusion, avant même le début de la réparation de la CDB, une réorganisation stricte de la chromatine médiée par des modifications spécifiques d'histones sert de plateforme de recrutement pour différentes protéines. Parmi elles, BRCA1 et 53BP1 exercent une dualité qui permet à la cellule d'enclencher la HR ou la NHEJ, respectivement.

## ii. La réparation par jonction des extrémités non-homologues

À l'inverse de la HR, la NHEJ est effective tout au long du cycle cellulaire et constitue donc le mécanisme de réparation des CDB principal chez les eucaryotes supérieurs. Ces organismes ont la particularité d'avoir un génome conséquent présentant beaucoup de séquences répétées. Dans une telle configuration, la HR pourrait être source de désalignements et générer des erreurs quand la NHEJ semble plus appropriée.

### 1. Mécanisme

À la base de la NHEJ, les extrémités de l'ADN endommagé sont reconnues par l'hétérodimère de protéines Ku70 et Ku80 (également appelée Ku86). Les analyses de cristallographie par rayons X ont montré que Ku70 et Ku80 ont une structure dite toroïdale (forme d'anneau) (Walker, Corpina and Goldberg, 2001) et s'enroulent autour des extrémités lésées. Une fois le complexe Ku-ADN formé, la protéine kinase DNA-PKcs est recrutée et fixe Ku80. En plus d'activer par la phosphorylation certaines protéines effectrices de la voie DDR, la protéine DNA-PKcs maintient les extrémités d'ADN suffisamment proches pour être jointes. Puis, la protéine Artemis, une exonucléase possédant une activité 5'-3', est recrutée au site endommagé. L'intérêt du recrutement d'une telle protéine provient du



fait que la lésion laisse souvent des extrémités dites incompatibles, dont les brins vacants ne permettent pas une jointure franche et correcte. Bien que la protéine Artemis possède intrinsèquement une activité exonucléase 5'-3', le complexe DNA-PKcs-Artemis est en plus doté d'une activité endonucléase 5'-3' et 3'-5', utilisé notamment dans le cas de la recombinaison V(D)J (Ma *et al.*, 2002). Un mécanisme alternatif permettant également la formation d'extrémités compatibles consiste non pas à adopter une stratégie de section mais plutôt une stratégie de polymérisation. En effet, les polymérases pol  $\mu$  et pol  $\lambda$ , si nécessaire, peuvent initier une polymérisation au départ du complexe Ku-ADN. La pol  $\mu$  a l'avantage de pouvoir réaliser une synthèse d'ADN indépendamment d'une séquence dite *template* alors que la pol  $\lambda$  est beaucoup plus flexible que les autres polymérases. Cependant, il a été montré que la présence de ces deux polymérases sont essentielles dans la réaction de end-joining (Ma *et al.*, 2004). Les extrémités de l'ADN lésé ayant été rendues compatibles sont enfin prises en charge par un complexe protéique composé de la ligase IV (Lig4), XRCC4 (en anglais « *X-ray repair cross-complementing protein 4* ») et XLF (en anglais « *XRCC4-like factor* ») pour réaliser l'étape de liaison (en anglais « *ligation* »). XRCC4 en particulier, avec l'aide de XLF, permettent à l'ADN ligase IV d'interagir avec l'ADN. La grande flexibilité du complexe ADN ligase IV-XRCC4-XLF permet de reformer une liaison entre des extrémités d'ADN complexes ou incompatibles, ce qui en fait un élément clé dans la réalisation de la NHEJ (pour revue (Lieber, 2010; Her and Bunting, 2018)) (figure 21). La simplicité de son mécanisme, sa rapidité – sa durée a été estimée à moins de 30 minutes (Mao *et al.*, 2008a) – ainsi que son indépendance face à une homologie de séquence fait de la NHEJ le mécanisme de réparation des CDB le plus utilisé tout au long des phases du cycle cellulaire mais est dès lors considérée comme étant un mécanisme *error prone*.

## 2. Un mécanisme *error prone* ou *error free* ?

En théorie, le mécanisme de coupure franche des extrémités d'ADN incompatible et leur liaison peut être considéré comme étant source de petites délétions et d'insertions et donc d'erreurs génomiques. En effet, la NHEJ a longtemps été considérée comme étant génératrice d'erreurs (en anglais « *error-prone* ») et source d'instabilité génomique importante. Cette simplification de ce qu'est la NHEJ rend ce postulat erroné. La NHEJ, tout comme la HR qui sera décrite plus tard, participent à la stabilité génomique et peuvent, dans certains cas, être sources de réarrangements chromosomiques.

Rappelons tout d'abord que la NHEJ est le mécanisme majoritaire dans les cellules des eucaryotes supérieurs pour réaliser la réparation d'une CDB. En effet, des études de knock-down de gènes tels *DCLRE1C* (gène codant Artemis) ou encore *PRKDC* (gène codant DNA-PKcs) ou l'utilisation de systèmes rapporteurs ont montré que la NHEJ était majoritaire tout au long du cycle et était responsable de la réparation d'environ 80% des CDB (Mao *et al.*, 2008b; Beucher *et al.*, 2009). Chez les levures et mammifères, il a été montré qu'entre 20 et 50% des clivages réalisés par des nucléases formant des extrémités cohésives pouvaient être réparés avec précision par la NHEJ (Lin, Lukacsovich and Waldman, 1999; Clikeman *et al.*, 2001). Weiffenbach et Haber ont par ailleurs montré que le pourcentage de NHEJ imprécises dans des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* mutées pour *rad52*, l'homologue fonctionnelle de *BRCA2* chez le mammifère, était de 1%, un chiffre revu à la baisse à 0,04% et 0,01% par d'autres études (Weiffenbach and Haber, 1981; Kramer *et al.*, 1994; Clikeman *et al.*, 2001). En plus de la réparation de l'ADN, la NHEJ est impliquée dans la recombinaison V(D)J. En effet, dans le processus de production des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T, les protéines RAG1 et RAG2 (*recombination activating genes 1 or 2*) génèrent une CDB dans des séquences de gènes codant les différentes parties de ces protéines. Les CDB se trouvant dans les domaines V (*Variable*), D (*Diversity*) et J (*Joining*) sont réparées par les protéines de la NHEJ. Ces réarrangements chromosomiques participent à la grande diversité des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T et nécessitent une très grande précision pour répondre aux mieux aux potentiels antigènes rencontrés par l'organisme. Ainsi, des mutations hypomorphes dans les gènes codant les facteurs de la NHEJ Artemis, DNA-PKcs, XLF ou encore l'ADN ligase IV, réduisant donc leur production, sont en partie responsable d'un syndrome appelé déficit immunitaire combiné sévère (SCID, *Severe Combined Immunodeficiency*) (pour revues (Soulas-Sprauel *et al.*, 2007; Malu *et al.*, 2012)). De la même façon, les souris immunodéficientes SCID utilisées en laboratoire possèdent des mutations notamment dans le gène *PRKDC* codant la DNA-PKcs (Jhappan *et al.*, 1997).

Dans des cellules de mammifères (cellules de hamster chinois en l'occurrence), Guirouilh-Barbat et ses collaborateurs ont mis en évidence un rôle crucial de la protéine Ku80 dans le maintien de la stabilité génomique. Grâce à l'utilisation de substrats chromosomiques clivables par l'enzyme de restriction I-SceI, les auteurs ont montré que des réarrangements chromosomiques telles que des délétions, inversions ou encore translocations pouvaient avoir lieu à l'issue de la NHEJ même avec peu de lésions produites. Cependant, l'utilisation de ces substrats dans les cellules xr6 déficientes en Ku80 a permis de montrer une augmentation de ces réarrangements et en particulier des délétions (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2004).

Cette étude met en exergue la précision de réparation apportée par KU80 dans le processus de end-joining. Plus tard, en utilisant également des substrats clivables par I-SceI, cette même équipe a pu montrer que des cellules déficientes en XRCC4 affichaient une activité NHEJ moins précise (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2007). Ensemble, ces travaux montrent le caractère conservatif de la voie canonique impliquant Ku80 et XRCC4 et prouvent ainsi l'efficacité de la NHEJ dans le maintien de la stabilité génomique.

### 3. Résistance thérapeutique

La NHEJ n'est donc pas intrinsèquement imprécise et la qualité de sa réparation dépend surtout de la structure des extrémités d'ADN lésées (pour revue (Bétermier, Bertrand and Lopez, 2014)). Ainsi, son activation peut être responsable d'une résistance thérapeutique. En effet, Beucher et collaborateurs ont montré qu'au moins 80% des CDB induites par irradiation étaient réparées par NHEJ qui participait alors au maintien du génome (Beucher *et al.*, 2009). Shen et collègues ont rapporté des augmentations significatives de l'ARNm et des protéines DNA-PKcs ainsi que de son activité enzymatique dans des cellules de leucémie HL60 résistantes à la doxorubicine (Shen *et al.*, 1998). Peu de temps après, la surexpression de *PRKDC* codant la DNA-PKcs et l'augmentation de son activité ont été caractérisées dans des cellules de cancer pancréatique CAPAN-1 et du col de l'utérus HeLa radiorésistantes (Ader *et al.*, 2002). De plus, des cultures primaires de cellules cancéreuses ovariennes exhibant une diminution de l'expression de Ku70 sont plus sensibles à l'induction de CDB de l'ADN par des traitements à base d'inhibiteurs de PARP (PJ34 ou olaparib) ou d'irradiation (de 0,5 à 5 Gy). Inversement, la réexpression de son gène entraîne une résistance à ces traitements (Jin *et al.*, 2016). Dans l'adénocarcinome ductal pancréatique (ACDP), l'inhibition de la DNA-PK par le composé NU7026 ou de Ku70 et Ku80 par siRNA a été associée à une accumulation de dommages à l'ADN, un arrêt de la progression tumorale ainsi qu'à une mort cellulaire importante. Par ailleurs, l'inhibition de la NHEJ sensibilise les cellules de la lignée de cancer pancréatique 8988T à l'irradiation. De manière intéressante, les auteurs ont trouvé que cette inhibition était accompagnée d'une augmentation de la HR en tant que système compensateur. Cette étude montre l'importance des systèmes de réparation des CDB et en particulier la NHEJ dans la résistance de cellules de cancer pancréatique à la radiothérapie (Li *et al.*, 2012). Enfin, Meng et al ont mis en évidence une résistance à l'antimétabolite MTX dans des cellules du cancer du côlon HT-29

exhibant une forte activité NHEJ par un mécanisme dépendant de la dihydrofolate réductase (DHFR) (Meng *et al.*, 2015).

Ensemble, ces études montrent que la NHEJ est un mécanisme essentiel dans le maintien du génome des cellules cancéreuses et participe donc à la résistance thérapeutique à différentes chimiothérapies à base de DDA ainsi qu'aux rayonnements ionisants utilisés en radiothérapie.

### iii. La réparation par recombinaison homologue

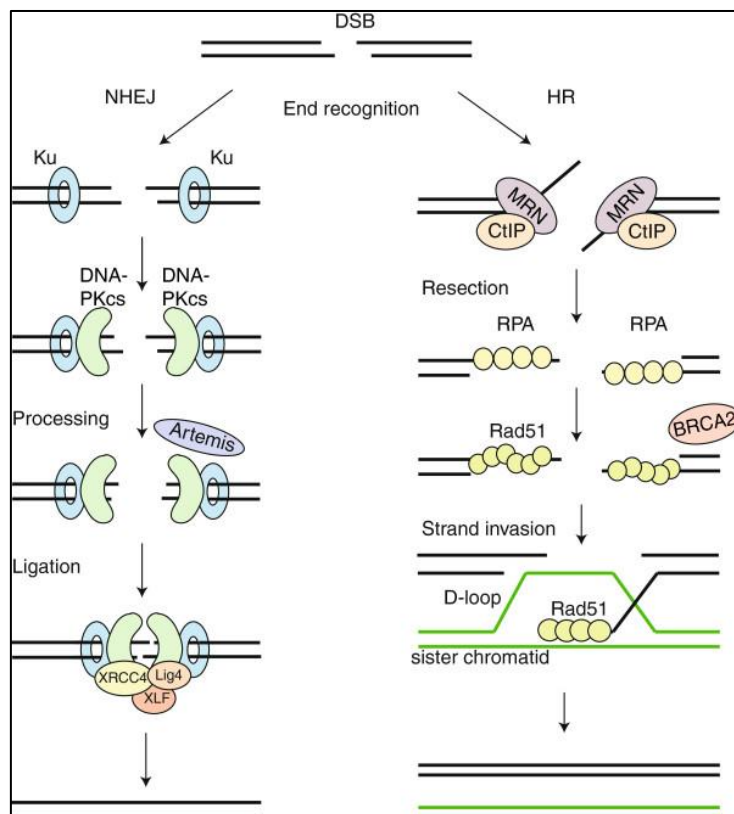
À l'inverse de la NHEJ, la HR est particulièrement utilisée par les organismes ayant des génomes de petite taille. En effet, les gènes impliqués dans ce type de réparation ont été découverts chez les protistes et ont été largement étudiés chez les bactéries et les levures chez lesquelles la HR est le type de réparation prédominant. Les eucaryotes inférieurs comme les protistes et les fungi ainsi que les procaryotes sont en effet parmi les génomes les plus petits du monde du vivant. Chez l'Homme, pour qui le génome est plus conséquent et plus complexe, la HR est tout de même utilisée dans la méiose et la formation des gamètes où elle participe à la diversité génétique. Elle est également utilisée pour réparer les CDB de l'ADN et dans la réactivation des fourches de réplication lorsque celles-ci sont arrêtées ou ralenties par diverses altérations pendant la phase S.

#### 1. Mécanisme

Quelle que soit l'espèce considérée, la HR suit trois étapes distinctes : une phase pré-synaptique, pendant laquelle les brins lésés sont traités. Une phase synaptique, pendant laquelle un des deux brins est polymérisé et envahit une séquence homologue. Enfin, une phase post-synaptique pendant laquelle les brins sont reliés entre eux. Chez l'Homme, pendant la phase pré-synaptique, la lésion est prise en charge par les protéines Mre11, Rad50 et Nbs1 (complexe protéique MRN) qui interagissent avec la protéine CtIP. CtIP possède une activité exonucléase 5'-3' et permet une resection des brins 5'. La resection de ces brins au départ de la voie DDR est une des conditions *sine qua none* de la HR. Elle la distingue donc de la NHEJ. Une fois la resection effectuée, les protéines RPA (*Replication Protein A*) vont reconnaître spécifiquement le monobrin d'ADN 3' vacant et le recouvrir afin d'empêcher sa dégradation et la formation de structures secondaires. La protéine Brca2 (*Breast Cancer 2*) médie le remplacement de RPA par la protéine Rad51. Celle-ci va alors faciliter la recherche d'homologie de séquence, notamment

au niveau de la chromatide sœur du brin endommagé, et induire l'invasion du brin 3' dans le double brin intact adoptant une forme de D-loop (en anglais « *displacement loop* ») pendant la phase synaptique. Le nucléofilament ADN-Rad51 va alors, par l'intermédiaire de différentes ADN polymérases (McVey *et al.*, 2016), s'étendre le long du brin d'ADN complémentaire servant de support à la polymérisation. Après le recouvrement de la séquence perdue lors du dommage, la phase post-synaptique est initiée et la séquence néosynthétisée capture le brin 5' resectionné et la jonction entre les deux se fait notamment par l'ADN ligase 1 dans une étape appelée jonction Holliday (figure 21) (Brandsma and Gent, 2012). La durée de la HR a été quant à elle estimée à environ sept heures (Mao *et al.*, 2008a). En raison de la présence nécessaire d'une séquence homologe, la HR est sollicitée principalement en fin de phase S et pendant la phase G2 du cycle cellulaire, après que la réplication du génome ait eu lieu et est considérée comme étant un mécanisme *error free*.

## 2. Un mécanisme *error free* ou *error prone* ?



**Figure 21. Mécanismes de réparation des CDB par NHEJ et HR.** La NHEJ génère une coupure franche ou polymérise les brins lésés afin de les lier entre eux. Elle représente environ 80% des réparations des CDB chez les mammifères. La HR effectue une resection du brin 5' qui envahit une séquence homologe pour reproduire la

séquence lésée. La liaison du brin néosynthétisé est résolu par une jonction de Holliday (figure de (Brandsma and Gent, 2012)).

Malgré la fidélité de son mécanisme, dans certains cas de figure, la HR peut être un élément mutagène. En effet, la conversion génique et les crossing-over qui s'opèrent généralement pendant ce processus de réparation résulte en un échange de matériel génétique et peut, dans certains cas, contribuer à une instabilité génomique (pour revue (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2014)). À l'instar de la NHEJ, la HR est un mécanisme de réparation de l'ADN qui participe dans la plupart des cas à la stabilité génomique mais peut, dans d'autres cas, contribuer à une mutagénicité.

### 3. Résistance thérapeutique

Il est estimé qu'environ 30% des cancers mammaires et ovariens sont dus à des mutations des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*, tous deux impliqués dans la HR (Malone *et al.*, 2000; Loman *et al.*, 2001; Hamann *et al.*, 2003). Bien que ces mutations soient une des causes de l'initiation tumorale, elles sont susceptibles de rendre les cellules plus sensibles aux thérapies. En effet, une activité HR peu efficace n'est pas compatible avec une viabilité cellulaire. L'activité HR reste élevée dans les cancers, en particulier dans les cancers mammaires résistants à la chimiothérapie (Mao *et al.*, 2009). Dans les cellules de la lignée mammaire HCC1428 et pancréatique CAPAN-1 et de cultures primaires de cancer de l'ovaire, Sakai *et al.* ont trouvé des mutations secondaires dans le gène *BRCA2* restaurant sa fonction et associées à une résistance au cisplatine (Sakai *et al.*, 2008). De la même façon, ils ont observé une augmentation de l'activité de Rad51, CDK1, CDK2 et de la conversion génique entre chromatide sœurs dans des xénogreffes de glioblastomes résistants au témozolomide (Gil Del Alcazar *et al.*, 2016). Cette étude montre qu'une des causes d'une résistance au témozolomide dans ce type de tumeur peut être expliquée par une activité HR augmentée. À l'inverse, la perte de *BRCA1/2* a été corrélée à une meilleure réponse au cisplatine et à un taux de survie global plus important (Tan *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011). Au-delà des mutations affectant l'expression de *BRCA1*, une hyperméthylation de son promoteur, réduisant ainsi la quantité de protéines Brca1 produites a été associé à une sensibilité accrue de cancers ovariens à la chimiothérapie (Teodoridis *et al.*, 2005). De la même façon, une équipe a mis en évidence, dans la lignée cellulaire de carcinome pancréatique CAPAN-1, que la délétion c.6174delT spécifique d'une mutation du gène *BRCA2*, restaurant ainsi sa fonction était responsable d'une résistance aux thérapies utilisant

des inhibiteurs de PARP (Edwards *et al.*, 2008). En plus de la résistance acquise aux molécules utilisées en chimiothérapie, la HR peut également s'avérer efficace dans la résistance aux rayonnements ionisants. Dans leur étude, Jin et ses collègues ont mis en évidence qu'une diminution de la protéine RNF8, une ubiquitine ligase impliquée dans l'initiation de la HR, corrèle à une sensibilité accrue à l'irradiation (Jin *et al.*, 2016). D'autres études ont permis d'établir un lien entre de fortes quantités de protéines Rad51 et une résistance à l'étoposide dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (Hansen, Lundin, Helleday, *et al.*, 2003; Hansen, Lundin, Spang-Thomsen, *et al.*, 2003).

Ensemble, ces études montrent l'importance de la HR dans la résistance aux chimiothérapies et radiothérapies induisant des CDB de l'ADN.

#### iv. Implication de la protéine tau dans la stabilité génomique

Dans le processus neurodégénératif, l'accumulation de dommages à l'ADN, notamment des CDB, est souvent décrite comme étant l'une des causes de la mort neuronale et la conséquence d'oligomères toxiques de tau et d'un stress oxydant accru (Mecocci, MacGarvey and Beal, 1994; Shanbhag *et al.*, 2019; Thadathil *et al.*, 2021). Cependant, ces dernières années, une hypothèse intéressante a émergée et propose que cette instabilité génomique soit la conséquence d'une perte-de-fonction physiologique de la protéine tau et suggère donc un rôle de tau dans le maintien du génome neuronal. En effet, un potentiel rôle de tau dans le maintien de l'intégrité de l'ADN a été rapporté *in vitro* face à une peroxydation et la dénaturation thermique (Hua and He, 2000; Wei *et al.*, 2008b). Des observations similaires ont été également faites *in cellulo* et *in vivo*. Dans les cerveaux de patients AD et dans des modèles de souris KO-tau, une accumulation de CDB a été retrouvée (Violet *et al.*, 2014; Shanbhag *et al.*, 2019).

En 2011, Sultan et al ont remarqué que l'expression de tau dans les neurones était corrélée à une protection face un stress hyperthermique pouvant induire des dommages oxydatifs. De plus, des analyses par Comet assay ont permis de montrer que des neurones déficients en tau (KO-tau) étaient associés à une accumulation de dommages à l'ADN. À l'inverse, une infection avec un vecteur adénoviral permettant l'expression de tau humaine limite l'accumulation de ces dommages. Les auteurs ont également trouvé que l'induction d'un tel stress entraînait une augmentation de la translocation nucléaire de tau. Cette étude a permis d'établir un rôle pour tau dans la protection du génome face à un stress inducteur de dommages à l'ADN (Sultan *et al.*, 2011). Ces observations ont été retrouvées plus tard par

Violet et al confirmant une fonction physiologique de tau dans la protection de l'intégrité génomique dans des modèles murins (Violet *et al.*, 2014). Une autre étude menée hors du processus neurodégénératif a permis d'étendre cet effet de tau à d'autres contextes physiopathologiques. Bou Samra et ses collaborateurs ont étudié l'instabilité génomique dans une pathologie rare appelée syndrome de Bloom (BS, *Bloom Syndrome*). Cette pathologie est caractérisée par une mutation perte-de-fonction du gène *BLM* codant pour une 3'-5' ADN hélicase et à une perte de la cytidine désaminase (CDA) menant à une instabilité génomique, un stress répliatif et des aberrations chromosomiques (Chabosseau *et al.*, 2011). Dans cette étude, les auteurs ont trouvé une corrélation intéressante entre la perte de CDA ( $CDA^{-/-}$ ) dans les cellules BS et une surexpression de *MAPT*. D'un point de vue mécanistique, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine couplées à la qPCR (ChIP-qPCR) ont montré que tau était enrichie dans les mêmes séquences promotrices et transcrites d'ADNr que celles du facteur UBTF (en anglais « *Upstream Binding factor* ») dans le nucléole (NOR, *Nuclear Organizing Regions*). En conclusion, les auteurs ont montré que la déplétion en tau diminue la stabilité génomique de l'ADNr et altère sa transcription. En effet, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre l'ARNm de *MAPT* a montré une augmentation de l'instabilité génomique dans les cellules  $CDA^{-/-}$ . Les auteurs ont alors conclu à un système de compensation dans lequel l'instabilité génomique apportée par l'absence de CDA permettait une surexpression de *MAPT* impliquée dans la stabilité génomique. En résumé, l'expression de *MAPT* peut être la conséquence d'une instabilité génomique trop importante dans des cellules  $CDA^{-/-}$  permettant alors de produire des protéines tau afin de restaurer une stabilité du génome. Cette étude est particulièrement intéressante puisqu'elle montre également, par des analyses *in silico*, que cette causalité entre déficience en CDA et surexpression de *MAPT* est également retrouvée dans les cancers du sein, du rein, de la prostate, des glandes surrénales et dans les paragangliomes (Bou Samra *et al.*, 2017). À l'instar de cette dernière étude, d'autres équipes ont démontré l'importance de tau dans la stabilité génomique des cellules cancéreuses. En étudiant le caryotype de fibroblastes et lymphocytes de patients atteints de démence lombaire frontotemporale, Rossi et collègues ont fait la démonstration que des mutations de *MAPT* étaient associées à une forte instabilité chromosomique. Les auteurs expliquent dans leur discussion que de telles mutations pourraient être responsables de l'occurrence de cancers (Rossi *et al.*, 2013). Cette corrélation entre mutations de *MAPT* et cancers a été démontrée. Dans une étude, Gargini et al ont montré que des familles ayant des antécédents de FTDP-17 avaient plus de risques de développer un cancer et inversement. Les auteurs de l'étude expliquent cette corrélation par ce postulat : les mutations de *MAPT* sont responsables d'aberrations



chromosomiques, d'une aneuploïdie et d'une forte instabilité génomique. Ce travail est particulièrement intéressant dans la mesure où il met en évidence un rôle de la protéine tau dans la cellule cancéreuse sur la stabilité génomique. Effectivement, les cancers survenant chez ces patients FTDP-17 possèdent un gène *MAPT* muté qui participe à l'instabilité génomique de ces cellules (Gargini, Segura-Collar and Sánchez-Gómez, 2019).

Les études de notre équipe (Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2014) et d'autres (Wei *et al.*, 2008b; Lu *et al.*, 2013; Bou Samra *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2018) ont montré que tau participait activement au maintien de la stabilité du génome dans les cellules du SNC et de la périphérie. Certaines de ces études proposent comme modèle de stabilité une liaison physique de la protéine tau à l'ADN. En effet, des études réalisées *in vitro* montrent que tau peut lier l'ADN et le protéger de diverses formes de dénaturations (Corces *et al.*, 1980b; Villasante *et al.*, 1981; Hua and He, 2000, 2003; Hua *et al.*, 2003). Toutefois, la plupart de ces expériences ont été menées uniquement *in vitro*, en dehors de tout contexte cellulaire et avec des protéines recombinantes pour la plupart. Bien qu'il soit possible que tau protège physiquement l'ADN contre diverses menaces cellulaires, une autre hypothèse intéressante, basée sur la littérature, peut être mise en avant. Des travaux récents ont montré qu'une déplétion de tau par shRNA ou CRISPR-Cas9, mimant alors une perte de fonction dans des cellules de la lignée de neuroblastome SH-SY5Y, était associée à une diminution de la protéine p53 par un mécanisme dépendant de MDM2, son régulateur négatif (Sola *et al.*, 2020). Cette étude montre que la protéine peut être imbriquée dans la voie DDR et potentiellement être impliquée dans la réparation des CDB, une hypothèse qui pourrait expliquer son rôle dans la stabilité génomique. Cette hypothèse est appuyée par certaines études qui ont montré des défauts d'activité de réparation de l'ADN dans les neurones présentant des formes pathologiques de tau. Par exemple, des défauts de la BER ont été rapportés dans la MA (Weissman *et al.*, 2007; Lillenes *et al.*, 2016). Ce type de réparation est particulièrement important dans les neurones notamment en condition de stress oxydant et de dommages oxydatifs. Chez les patients Alzheimer, une diminution de la quantité des protéines Pol $\beta$  (ADN polymérase  $\beta$ ), UNG (*Uracil-DNA glycosylase*) ou encore OGG1 (*8-Oxoguanine glycosylase*) impliquées dans la BER a été retrouvée par Weissman *et al.* (Weissman *et al.*, 2007). Une autre étude a également mis en évidence une altération de certaines protéines de la BER dont une diminution d'OGG1. Cependant, elle a également permis de montrer une augmentation de la protéine PARP1 et Pol $\beta$  (Lillenes *et al.*, 2016). La protéine Ref-1 impliquée dans la BER a également été retrouvée augmentée dans les cerveaux post-mortem de patients Alzheimer (Davydov, Hansen and Shackelford, 2003). En plus des dommages oxydatifs initialement présents dans

les neurones, une accumulation de CDB est observée en particulier dans les tauopathies et cellules déficientes en tau (Suberbielle *et al.*, 2013; Kurihara *et al.*, 2019; Nakamura *et al.*, 2020). Dans d'autres travaux, des diminutions de protéines ATM (Shen *et al.*, 2016), DNA-PKcs et Ku80 (Davydov, Hansen and Shackelford, 2003; Shackelford, 2006) ont été retrouvées dans les noyaux de neurones de cerveaux Alzheimer. Ces études sont particulièrement intéressantes puisque qu'elles donnent une première explication à l'accumulation de dommages à l'ADN dans ces neurones. De surcroît, ces lésions semblent être apportées ici par des défauts d'activité de réparation de l'ADN, notamment et en particulier la NHEJ. Le rôle de tau dans de telles variations protéiques n'est cependant pas établi mais permettent de poser l'hypothèse selon laquelle la stabilité génomique apportée par tau pourrait être impliquée dans des mécanismes de réparation de l'ADN.

De manière intéressante, l'étude de Rossi de 2013 a tenté de lier l'instabilité chromosomique retrouvée en présence de mutations de *MAPT* et une défaillance de mécanismes de réparation de l'ADN. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé la bléomycine et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) pour évaluer la sensibilité de cellules lymphoblastoïdes immortalisées (LCL) issues de trois patients porteurs de FTDP-17. La méthode employée par les auteurs consistait à comparer l'index mitotique (le pourcentage de cellules subissant une mitose sur une population générale) ainsi que le pourcentage de métaphases présentant des lésions en fonction de la concentration en bléomycine et  $H_2O_2$ . Les auteurs concluent en une diminution légèrement plus importante de l'index mitotique pour les patients porteurs d'une protéine tau mutée et aucune différence dans le pourcentage de métaphases avec des lésions. (Rossi *et al.*, 2013). Bien que cette méthode permette d'évaluer les altérations génomiques, elle ne permet pas de conclure clairement à des différences d'activité de réparation de l'ADN, celles-ci pouvant être mesurées par d'autres techniques (Seluanov, Mao and Gorbunova, 2010). De plus, la faible puissance statistique ne permet pas d'obtenir une significativité entre les deux groupes.

L'hypothèse selon laquelle la protéine tau peut être impliquée directement ou indirectement dans les mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN reste posée. Dans un contexte neurodégénératif, cela pourrait expliquer pourquoi la perte de fonction de tau dans les neurones atteints ou les modèles animaux KO-tau présentent une accumulation de dommages double brins de l'ADN. Dans un contexte oncologique, cela supposerait que les DDA utilisés en chimiothérapie ou les rayonnements ionisants en radiothérapie induiraient moins de CDB en présence de tau, favorisant la survie et le développement de la tumeur.

## **Cette hypothèse a été étudiée dans le premier objectif de cette thèse.**

### 4. Les inhibiteurs de HDAC et les altérations épigénétiques

Le génome est compartimenté dans des territoires chromosomiques qui peuvent être sous forme d'hétérochromatine constitutive ou facultative ainsi que sous forme d'euchromatine qui peut être transcrite ou non. Cette organisation de la chromatine est médiée par des modifications d'histones telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation ou encore l'ubiquitinylation et régule l'expression génique ou encore la stabilité du génome. Les centromères par exemple sont fortement dépendant de l'organisation de la chromatine plutôt que de leurs séquences d'ADN (Dobie *et al.*, 1999). Cette région appelée hétérochromatine péricentromérique (HPC) et dans laquelle se trouve des séquences répétées d'ADN satellites  $\alpha$ , participe à la ségrégation correcte du matériel génétique pendant la mitose, à la répression génique et au maintien de la stabilité génomique (Nair, Shoaib and Sørensen, 2017). L'HPC est définie par la marque épigénétique H3K9me3 ainsi que par certaines protéines d'hétérochromatine telles que HP1 $\alpha$  permettant de maintenir la chromatine dans un état compacté. Bien que cette région soit décrite dans la littérature comme étant majoritairement hypoacétylée, il y a été montré que l'histone H4 en particulier pouvait avoir des résidus lysine acétylés (Turner, Birley and Lavender, 1992).

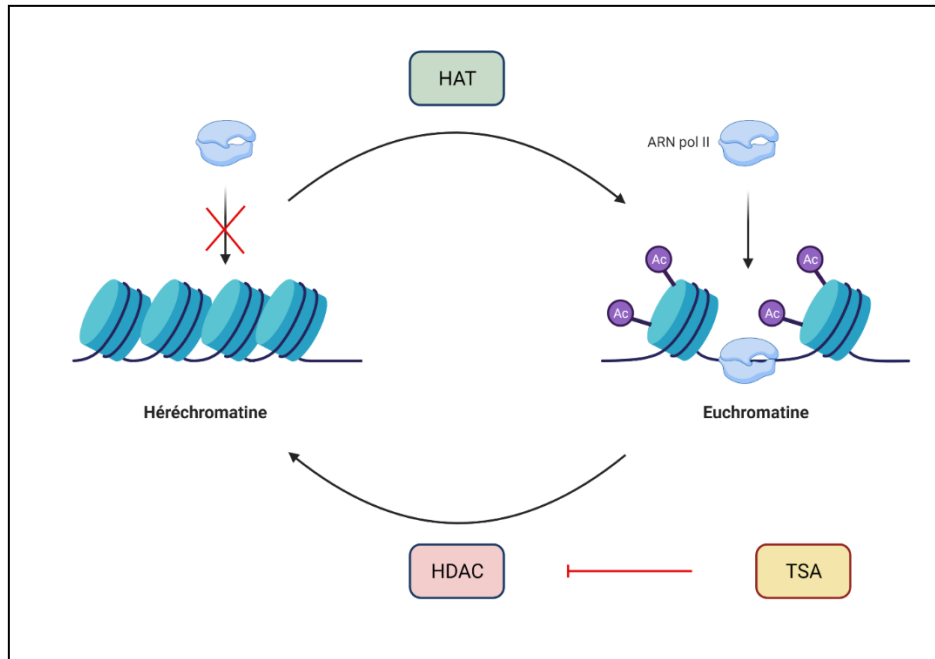
La modulation de l'acétylation des histones joue un rôle essentiel dans l'état de la chromatine et l'activité transcriptionnelle est régulée par les activités opposées des histones acétyltransférases (HAT) et des histones désacétylases (HDAC). D'un point de vue mécanistique, les HAT apportent un groupement acétyle qui charge négativement la lysine acétylée et entraîne sa répulsion des groupements phosphates de l'ADN également chargés négativement. L'acétylation des lysines est réversible grâce aux HDAC qui, comme leur nom l'indique, retire le groupement acétyle. Cela a alors pour conséquence un rapprochement des nucléosomes les uns des autres entraînant la compaction de la chromatine ainsi qu'au recrutement de facteurs répresseurs de l'activité transcriptionnelle (Stengel and Hiebert, 2015). Ces dernières années, l'intérêt pour les HDAC s'est développé en raison de leur implication dans le cancer colorectal (Wilko Weichert *et al.*, 2008), gastrique (Song *et al.*, 2005), prostatique (W. Weichert *et al.*, 2008), mammaire (Krusche *et al.*, 2005) ou encore pulmonaire (Minamiya *et al.*, 2011) où ils sont fréquemment surexprimés. Dans ces cancers, les HDAC modifient l'expression génique. Par exemple, le gène *CDKN1A* codant la protéine régulatrice du cycle cellulaire p21<sup>waf1/cip1</sup> est sous-exprimé dans beaucoup de cancers du fait d'une hypoacétylation dans ses régions promotrices. Il a été montré que

l'inhibition spécifique de HDACs permet de rétablir un niveau d'acétylation favorable à une réexpression de *CDKN1A* et un meilleur contrôle du cycle dans ces cancers (Gui *et al.*, 2004). D'autres gènes sont fortement régulés par ces différences d'acétylation. Récemment, il a été montré que deux tiers de cellules de la lignée cancéreuse HeLa résistantes à la radiothérapie avaient qu'une diminution d'expression du gène *GADD45A* due à un maintien de l'hétérochromatine au niveau de son promoteur (Lou *et al.*, 2021). Aussi, les gènes *BRCA1* et *ATR* sont également des cibles de HDACs dans les cancers (Eot-Houllier *et al.*, 2009). L'intérêt d'inhiber l'activité des HDACs a donc émergé ces dernières années.

#### a. Les thérapies

Le développement d'inhibiteurs de HDAC (HDACi, *HDAC inhibitors*) a ainsi vu le jour. Les HDACi entraînent une accumulation de protéines histones et non-histones acétylées altérant ainsi l'expression génique (Glaser *et al.*, 2003; Mitsiades *et al.*, 2004). Une partie de leur mécanisme d'action repose sur la réexpression de gènes initialement réprimés – notamment ceux impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose. Néanmoins, il a été estimé que seulement 2% à 5% des gènes sont modulés par l'effet des HDACi (Van Lint, Emiliani and Verdin, 1996; Glaser *et al.*, 2003). Une autre partie du mécanisme consiste en une perturbation de l'organisation de l'HPC. Cette région a un temps de réplication plus lent que les régions d'euchromatine. Ainsi, un traitement à long terme de cellules HeLa avec la TSA, un HDACi non spécifique, entraîne une acétylation des histones nouvellement synthétisées qui vont alors s'incorporer dans la région de l'HPC au fur et à mesure des cycles. Ce traitement a été associé à une perte de l'HPC, une dispersion de la protéine HP1 dans le noyau, une perte de la marque H3K9me2 ainsi qu'une hyperacétylation des histones H3 et H4 dans la périphérie nucléaire (figure 22). Cette perte d'HPC génère une forte instabilité génomique et, à terme, à l'apoptose (Taddei *et al.*, 2001). De manière intéressante, l'utilisation de HDACi conduit également à la formation de dommages à l'ADN. En effet, il a été montré que la TSA induit une diminution de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN dont Ku70, ATR, BRCA1/2, NBS1 ou encore la protéine BLM (Zhang *et al.*, 2007). En relaxant la chromatine, les HDACi favorisent la formation de CDB et ont été décrits dans les leucémies myéloïdes chroniques comme pouvant potentialiser l'effet de chimiothérapies endommageant l'ADN (pour revue (Pourrajab *et al.*, 2020)). La plupart de ces HDACi dont le vorinostat, belinostat, panobinostat ou encore l'endotinostat sont aujourd'hui approuvés par la FDA pour le traitement des lymphomes T cutanés (CTCL, *Cutaneous T-Cell Lymphoma*) et lymphomes T périphériques (PTCL, *Peripheral T-Cell Lymphoma*) (Chen, Sethy and Liou, 2020). En raison de leur efficacité dans les tumeurs hématologiques,

il a été important par la suite de considérer leur utilisation dans les tumeurs solides. Toutefois, l'utilisation de faibles doses limite leur efficacité alors que l'utilisation de fortes doses entraîne des effets secondaires importants et remet en question leur utilisation (Shah, 2019).



**Figure 22. Effet de la TSA sur l'organisation de la chromatine.** La TSA est une inhibitrice non spécifique des HDAC. Des traitements à long termes et à de faibles concentrations de TSA modifient l'organisation de la chromatine pouvant mener à une réexpression de gènes initialement réprimés et à une instabilité génomique dans les régions d'HPC (Created with BioRender.com).

#### b. Les résistances

Les HDACi, nous l'avons vu, modifient l'organisation de la chromatine. Dans certains cas, les effets des HDACi sont altérés par différents mécanismes et empêchent l'expression de leurs gènes cibles. En plus des mécanismes de résistance commun aux HDACi tels que l'accessibilité de la molécule à la cellule, les modifications intracellulaires de la molécule ou encore son export par les pompes d'efflux, les HDACi possèdent leurs propres mécanismes de résistance. Parmi eux, une suractivation de protéines impliquées dans la voie DDR telles que Chk1 (Lee *et al.*, 2011), une modulation de l'apoptose (Bolden, Peart and Johnstone, 2006) ou encore l'activation de certaines voies de signalisation (Dai *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2011). Cependant, les mécanismes expliquant l'efficacité limitée des HDACi dans la réexpression de gènes cibles restent peu connus.

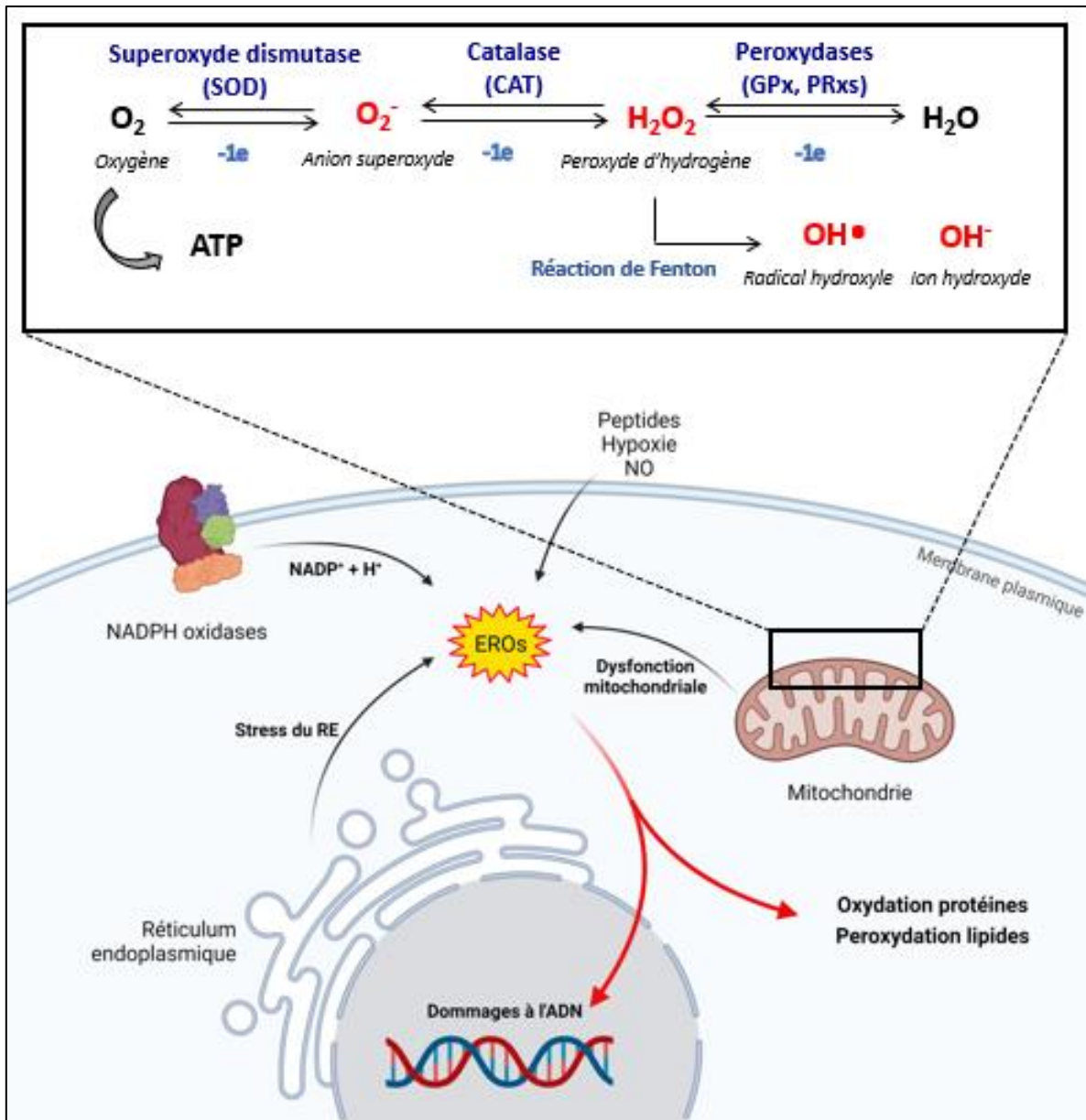
Dans un modèle de *Drosophile*, Frost et collègues ont démontré que la perte de protéine tau était associée à des altérations de l'organisation de la chromatine caractérisée par une perte de H3K9me<sub>2/3</sub> et de HP1 et on émet l'hypothèse que ces altérations sont dues à des dommages oxydatifs de l'ADN. Par conséquent, cette perte de tau associée à une relaxation de l'hétérochromatine permet une réexpression de gènes qui étaient initialement réprimés (Frost, Hemberg, Lewis and Mel B. Feany, 2014). Cette étude a permis de suggérer une fonction physiologique de tau dans l'organisation de l'hétérochromatine. Plus tard, une étude réalisée dans des cultures primaires de neurones a démontré qu'un KO-tau était associé à une perte d'HPC ainsi qu'une relocalisation de HP1 $\alpha$  dans le noyau. De manière intéressante, les auteurs de cette étude ont trouvé que tau était associée aux régions de la chromatine enrichies en H3K9me<sub>3</sub> et HP1 $\alpha$  ainsi que dans les régions proches de l'HPC. La présence d'une protéine tau nucléaire (tau-NLS) a permis de sauver les altérations de l'HPC (Mansuroglu *et al.*, 2016b). Ensemble, ces études démontrent un rôle de tau dans l'organisation et le maintien de l'HPC et une stabilité de cette région. Plus récemment, une étude à grande échelle menée sur l'épigénome du cortex préfrontal de 669 patients atteints de la MA a permis de montrer que la pathologie tau est associée à une augmentation de l'histone acétylée H3K9ac (Klein *et al.*, 2019). De manière intéressante, les différentes études de Rossi ont permis de montrer que cette fonction de tau pouvait être étendue à des cellules non-neuronales. Dans leurs travaux, les auteurs ont mis en évidence que des mutations de de tau génèrent une instabilité génomique des modifications de la structure chromatinienne (Rossi *et al.*, 2008, 2013, 2018).

Ces différentes observations montrent donc un rôle de tau dans l'organisation et le maintien de l'hétérochromatine. Bien que la plupart de ces études aient trouvé des pertes de marques épigénétiques et de protéines associées à l'HPC, aucune n'a pu décrire un quelconque mécanisme. Les études de Rossi montrent que cette fonction de tau peut également être retrouvée dans les cellules périphériques et affecter la stabilité génomique des cancers. À l'instar des neurones, la protéine tau dans ces cellules cancéreuses pourrait alors contribuer au maintien de la structure de la chromatine et constituer un mécanisme de résistance aux HDACi.

**Cette hypothèse a été étudiée dans le deuxième objectif de cette thèse.**

## 5. Le stress oxydant : un mécanisme commun à plusieurs thérapies

Lors de la production d'ATP, les réactions de la chaîne de phosphorylations oxydatives (OXPHOS) utilisent l'oxygène comme substrat afin de produire de l'ATP. Seulement, pendant les échanges d'électrons à travers la membrane mitochondriale, environ 1 à 2% de ce qui est produit constitue des dérivés de l'oxygène (figure 23) (Ott *et al.*, 2007). Ces derniers sont des molécules de dioxygène ayant subi des échanges d'électrons. Ces dérivés appelés espèces réactives de l'oxygène (EROs) jouent un rôle important dans plusieurs processus cellulaires tels que la transduction du signal, l'expression génique, la formation de ponts disulfures au sein des protéines néosynthétisées ou encore dans l'apoptose (Sosa *et al.*, 2013). Outre cette origine mitochondriale, le stress oxydant peut être généré au niveau du RE, du complexe membranaire protéique NAD(P)H oxydases (NOX) ou avoir une origine extracellulaire par le biais de différentes protéines comme le peptide  $\beta$ -amyloïde (Butterfield, Swomley and Sultana, 2013), de monoxyde d'azote (NO) (Luperchio, Tamir and Tannenbaum, 1996) ou lors d'une hypoxie (Brown and Bicknell, 2001; Azimi *et al.*, 2017) (figure 23). En raison de leur potentiel oxydant, l'excès d'EROs peut entraîner des modifications délétères des protéines, lipides et acides nucléiques. De ce fait, des enzymes antioxydantes sont mises en place par la cellule afin de contrebalancer la production d'EROs. Parmi elles la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), les glutathion peroxydases (GPx) et peroxyrédoxines (PRx) éliminent les EROs (figure 23). Dans certaines conditions pathologiques, la balance entre la production et l'élimination d'EROs est déséquilibrée en faveur de leur production. La cellule est donc dans un état de stress oxydant. En raison de l'oxydation des protéines, lipides et acides nucléiques qu'il peut générer, le stress oxydant mène à la sénescence, la mort cellulaire ou à la carcinogenèse (pour revue (Trachootham, Alexandre and Huang, 2009)).



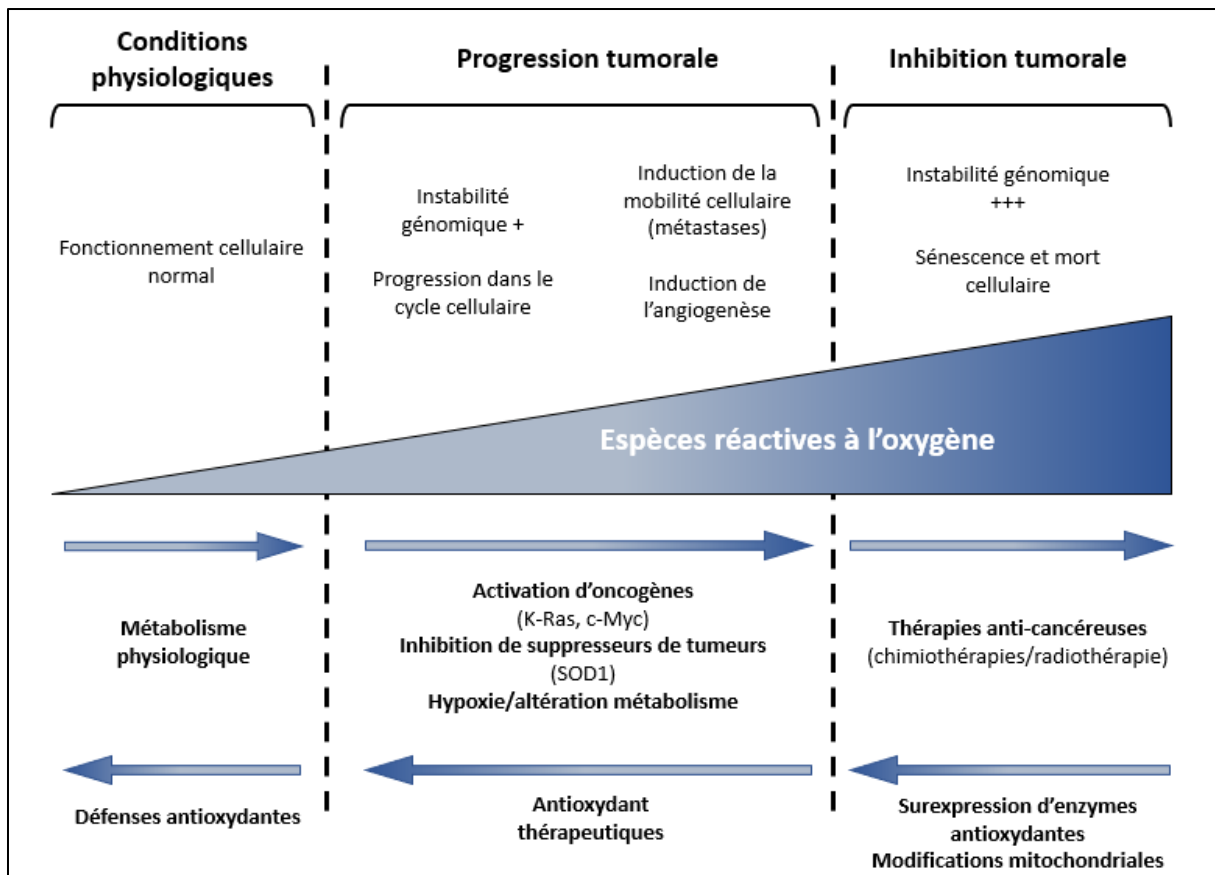
**Figure 23. Origines du stress oxydant.** L'origine du stress oxydant peut être extracellulaire et due à des peptides (par exemple le peptide  $\beta$ -amyloïde dans la MA), une hypoxie dans les cancers ou le monoxyde d'azote comme second messenger ou intracellulaire dues à des altérations de la mitochondrie (modifications de la chaîne OXPHOS, de leur localisation ou de leur morphologie) au complexe membranaire NOX qui permet la formation de  $NADP^+ + H^+$  ou encore d'un stress du RE (Created with BioRender.com).

Le principal dommage à l'ADN généré par les EROs est l'oxydation de la guanine en 8-oxoguanine (8-oxoG) (Floyd, 1990) générant des mésappariements 8-oxoG-A (Cheng *et al.*, 1992). En effet, une accumulation d'EROs est observée dans les cancers et participent à leur progression (Trachootham, Alexandre and Huang, 2009; Weinberg and Chandel, 2009). Souvent, des mutations gains de fonction



d'oncogènes tels que Ras (Irani *et al.*, 1997) ou perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs comme SOD1 (Elchuri *et al.*, 2005) accentuent la production d'EROs créant ainsi une boucle renforçant l'agressivité tumorale. En plus de l'instabilité génomique qu'ils génèrent, les EROs peuvent augmenter l'agressivité tumorale en agissant comme seconds messagers et en activant, dans certains cas, des voies de signalisation comme la voie des PI3k/Akt et la voie des MAPK. Il a été montré par exemple que le peroxyde d'hydrogène pouvait activer les protéines Erk1/2 dans les cancers du sein (Reddy and Glaros, 2007) et la protéine Akt dans des cancers de l'ovaire (Liu *et al.*, 2006). En plus des éléments extracellulaire favorisant la genèse d'EROs comme l'hypoxie (Chandel *et al.*, 1998; Rathore *et al.*, 2008), les altérations mitochondriales inhérentes aux cellules cancéreuses constituent une source d'EROs importante. Par exemple, la signalisation calcique est impliquée dans plusieurs types de cancers dont les cancers du sein et de la prostate (So *et al.*, 2019; Ardura *et al.*, 2020) et a été associée à une augmentation du flux d'électrons dans la chaîne OXPHOS et donc d'EROs (Feissner *et al.*, 2009; Peng and Jou, 2010). Cette signalisation  $Ca^{2+}$  est également augmentée par le facteur  $TNF\alpha$  qui participe donc, dans les cancers, à l'augmentation d'EROs (Aggarwal *et al.*, 2006; Dada and Sznajder, 2011). De plus, il a été montré que l'oncogène c-Myc peut perturber la chaîne OXPHOS et la glycolyse aérobie induisant l'apoptose (Tomiyama *et al.*, 2006; Wise *et al.*, 2008) tout comme l'oncogène K-Ras également impliqué dans la génération d'EROs (Weinberg *et al.*, 2010). En plus de la génération d'EROs, dans certains cas, des diminutions de protéines impliquées dans la détoxification cellulaire ont été rapportées. Ainsi, la catalase (Doskey *et al.*, 2016), manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) (Cullen *et al.*, 2003) ou encore les glutathiones peroxidases comme la GPx2 (Woenckhaus *et al.*, 2006) et GPx3 (Yu *et al.*, 2007) sont diminuées dans plusieurs types tumoraux.

Le stress oxydant est donc un évènement inhérent à la cellule cancéreuse. Il participe en partie à la cancérogenèse et renforce la croissance tumorale par différents mécanismes. Cependant, par sa nature cytotoxique, il altère la structure chimique des principales macromolécules tels que les lipides, protéines, glucides et acides nucléiques et constitue alors un des talons d'Achille de la cellule cancéreuse. Cette caractéristique bien spécifique présente l'intérêt de pouvoir être exploité en thérapie pour cibler principalement les cellules cancéreuses en les distinguant des cellules saines (figure 24).



**Figure 24. Paradoxe du stress oxydant : favorable et défavorable à la progression tumorale.**

L'accumulation d'EROs dans les cellules « normales » peuvent mener à la cancérogenèse. Cette accumulation vient principalement d'activation d'oncogènes ou de perte de suppresseurs de tumeurs ainsi que de l'hypoxie ou d'un métabolisme mitochondrial altéré. Cette particularité est exploitée en thérapie pour entraîner une instabilité génomique trop importante et entraîner la mort cellulaire. Les défenses antioxydantes et les modifications mitochondriales peuvent jouer un rôle primordial dans la résistance thérapeutique en limitant l'accumulation d'EROs induite par les thérapies anti-cancéreuses. (adapté de (Liou and Storz, 2010)).

a. Les thérapies induisant un stress oxydant

Initialement, deux approches principales ont été adoptées pour exploiter l'excès d'EROs dans les cellules cancéreuses : la génération d'EROs exogènes ou l'inhibition des systèmes antioxydants. Parmi les générateurs d'EROs, le motexafin gadolinium induit la formation d'anion superoxyde intracellulaire et est en phase III en combinaison avec d'autres thérapies (Evens, Balasubramanian and Gordon, 2005). Le  $\beta$ -lapachone est une quinone qui, une fois métabolisée par la NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), exacerbe la quantité d'EROs et produit un stress oxydant délétère pour des cancers NSCLC (Bey *et al.*, 2007). Des inhibiteurs de la SOD tels que le mangafodipir ou le 2-méthoxyestradiol, un

dérivé des œstrogènes, ont montré des effets probants contre des cellules leucémiques et de cancer du côlon. De manière intéressante, ces molécules pro-oxydantes sont efficaces contre ces cancers sans induire d'effets toxiques sur des lymphocytes et leucocytes, démontrant l'efficacité de cette approche (Huang *et al.*, 2000; Alexandre *et al.*, 2006). Pour cette raison, d'autres molécules comme la ménadione (vitamine K3), qui produit des EROs en diminuant la quantité de NAD(P)H sont testés chez l'Homme en raison de leur activité antitumorale *in vitro* et *in vivo* (Jamison *et al.*, 2001; Tareen *et al.*, 2008). En plus des effets bénéfiques de ce type de composés, il a été démontré que la majorité des thérapies couramment utilisées en cliniques induisent également un stress oxydant. Dans une étude, il a été montré qu'un traitement de cellules K562 de leucémie myéloïde chronique au paclitaxel induisait une apoptose associée à un stress oxydant (Meshkini and Yazdanparast, 2012). Une étude plus récente a confirmé un lien entre l'apoptose induite par les taxanes et ce type de stress. En effet, les auteurs ont validé le rôle cytotoxique du paclitaxel et ont montré que l'ajout de N-acétylcystéine (NAC), un antioxydant largement utilisé expérimentalement, permettait d'atténuer la proportion de cellules apoptotiques. En plus d'un effet négatif sur la voie PI3K/Akt et positif sur la voie MAPK, les auteurs ont remarqué une diminution de la superoxyde dismutase (SOD) par le paclitaxel d'une façon concentration-dépendante (Ren *et al.*, 2018). La mitochondrie étant le principal lieu de production des EROs, des études ont établi des liens étroits entre la toxicité des taxanes et le stress oxydant d'origine mitochondrial. En utilisant un antioxydant mitochondrial, le MitoVitE, l'équipe de Galley a par exemple montré qu'un traitement au paclitaxel induit une augmentation de stress oxydant *in vitro* et *in vivo* à travers au moins trois mécanismes : une perte du potentiel de membrane mitochondrial, une diminution de l'activité métabolique des mitochondries ainsi qu'une diminution importante de glutathione (McCormick *et al.*, 2016). Bien que ces études précédentes expliquent que le paclitaxel induit une accumulation d'EROs selon tel mécanisme, la perturbation de la dynamique microtubulaire et donc les défauts de transports des mitochondries peut également contribuer à l'occurrence d'un stress oxydant. En effet, des défauts de transport de mitochondries dans les neurones ont été corrélés à une apparition de stress oxydant (Liao, Tandarich and Hollenbeck, 2017).

En plus des taxanes, les anthracyclines comme la doxorubicine et la daunorubicine peuvent induire un stress oxydant. D'un point de vue biochimique, la doxorubicine est composée d'un ose et de quatre cycles dont l'un d'entre eux a une structure de quinone. Cette dernière, peut être réduite en semiquinone, ce qui a pour conséquence une dérégulation de la chaîne de transport d'électron mitochondriale (Davies and Doroshow, 1986; Doroshow and Davies, 1986; Gille and Nohl, 1997) ou une perturbation des flux

calciques (Solem, Henry and Wallace, 1994). La doxorubicine génère alors des effets secondaires importants notamment dans le muscle cardiaque où elle induit une cardiotoxicité importante (Gille and Nohl, 1997). Plusieurs études ont retrouvé des effets similaires pour la doxorubicine (Kalivendi *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2010; Bielak-Zmijewska *et al.*, 2014; De Falco *et al.*, 2016). Cette anthracycline, nous l'avons vu, a pour principal effet secondaire une cardiotoxicité. La bléomycine a elle aussi des effets secondaires liés au stress oxydant, en générant par exemple une fibrose pulmonaire. Teixeira et ses collègues ont montré en 2008 que l'administration de NAC à des souris préalablement traitées à la bléomycine entraînait une diminution des dommages pulmonaires. De plus, les auteurs de ce travail ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la SOD en condition de stress induit par la bléomycine. Ainsi, ce radiomimétique est capable d'induire un stress oxydant *in vivo* (Teixeira *et al.*, 2008). Une étude similaire avait déjà montré un effet pro-oxydant de la bléomycine chez le rat (Durairaj *et al.*, 2006). Il a été montré par Patel et al que la bléomycine déplete la GSH intracellulaire dans des cellules endothéliales et que cet effet n'était pas retrouvé en présence de NAC, confirmant ainsi un rôle de la bléomycine dans l'induction d'un stress oxydant (Patel *et al.*, 2011).

Quelques années après la découverte de la radioactivité, Miroslaw Kernbaum mena une expérience intéressante qui consista à utiliser une source de radium générant des rayonnements  $\beta$  sur de l'eau. Il observa ainsi une émanation de dihydrogène pur sous forme gazeux et conclut que cette irradiation induit une décomposition de l'eau sous la formule :  $2 \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2$ . Les rayonnements sont donc capables d'ioniser les molécules d'eau et générer du peroxyde d'hydrogène dans un évènement appelé « radiolyse de l'eau » (Kernbaum, 1909). La radiothérapie est donc, en plus de la chimiothérapie, génératrice d'EROs et source de stress oxydant dans nos cellules. Des observations faites par Leach et al ont permis d'établir que l'utilisation d'une source de strontium 90 ( $^{90}\text{Sr}$ ) générant des rayons  $\gamma$  sur des cellules de carcinome de l'épiderme A431 entraîne une production d'EROs. En utilisant des cellules d'une lignée d'ostéosarcome déplétées en chaîne de transport d'électrons mitochondriale, les auteurs ont mis en évidence qu'aucune de ces cellules n'exhibaient un stress oxydant après irradiation, montrant ainsi que les EROs produites par les rayonnements peuvent aussi trouver leur origine à la mitochondrie (Leach *et al.*, 2001). De manière intéressante, il a été montré que ce stress oxydant induit par ces rayonnements est transmis aux cellules filles (Clutton *et al.*, 1996; Rugo and Schiestl, 2004). D'autres études ont confirmé cet effet pro-oxydant de l'irradiation *in vitro* et *in vivo* (Dayal *et al.*, 2008; Aykin-Burns *et al.*, 2011; Barjaktarovic *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2012).

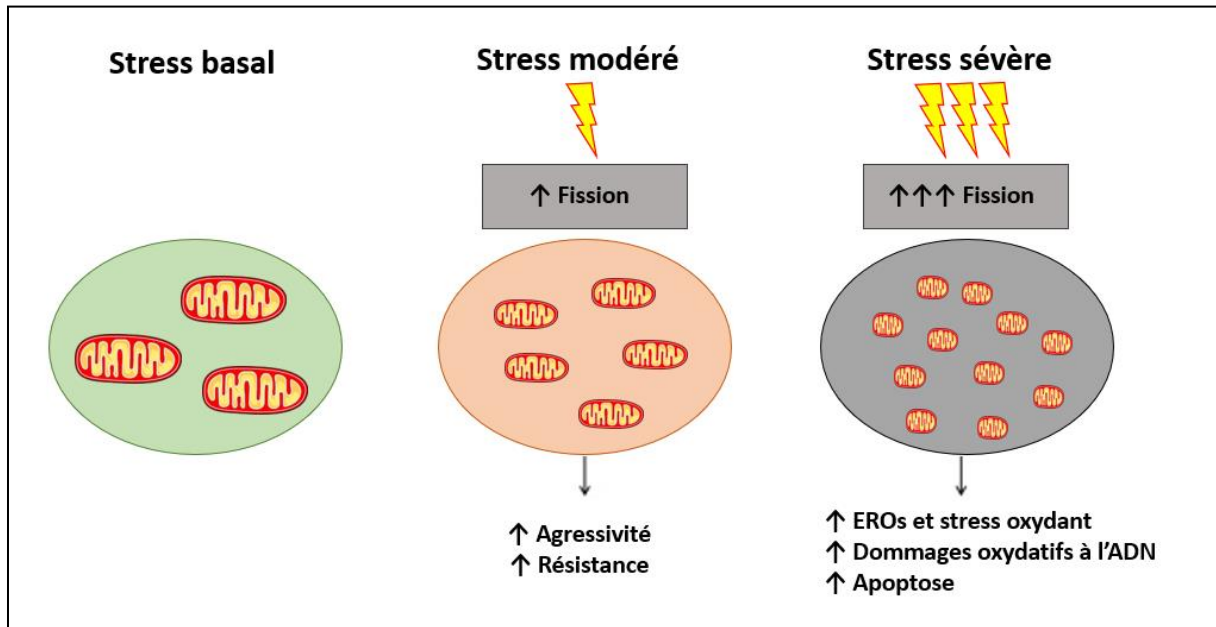
Malgré les effets anticancéreux intéressants de plusieurs types de thérapies induisant un stress oxydant, certaines cellules cancéreuses peuvent mettre en place différents mécanismes de résistance permettant d'échapper à la mort cellulaire. Parmi elles, l'augmentation des défenses antioxydantes ainsi que des modifications mitochondriales peuvent contrebalancer l'effet toxique des EROs et permettre à la cellule cancéreuse de survivre.

#### b. La résistance au stress oxydant

Une des caractéristiques des cancers est un métabolisme cellulaire altéré. Brièvement, une surconsommation de glucose par la cellule cancéreuse va générer une augmentation de la glycolyse et une surproduction de pyruvate. Ce dernier, normalement utilisé par la mitochondrie dans les cellules saines pour produire l'ATP, est fermenté en acide lactique par la cellule cancéreuse. Cet événement décrit dans la fin des années 1920 par Otto Warburg et ses collègues est connu sous le nom d'effet de Warburg et consiste donc en une faible utilisation de la mitochondrie par la cellule cancéreuse (Warburg, Wind and Negelein, 1927). Seulement, certaines cellules cancéreuses peuvent s'adapter et réutiliser leurs mitochondries pour échapper aux toxicités apportées par certains traitements.

Dans les gliomes, il a été montré que la protéine TRAP1 permet de reprogrammer le métabolisme mitochondrial de façon à réduire la quantité d'EROs produites par un mécanisme dépendant de la protéine de détoxification SOD2 (Yoshida *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2019). Cette augmentation de SOD2 se traduit par une réduction de peroxyde d'hydrogène cellulaire et à une radiorésistance importante dans ces gliomes (Lee *et al.*, 2004). De manière intéressante, cette dernière étude a également montré que des augmentations de glutathion peroxydases et réductases ainsi que la catalase étaient également intensément augmentées dans ces cellules cancéreuses et apportaient également une résistance au cisplatine. Dans des lignées cellulaires MDA-MB-231, HeLa et A549, l'inactivation ou l'inhibition de l'antioxydant peroxyrédoxine 1 (PRDX1) apporte une hypersensibilité à l'apoptose induite par la ménadione (également appelée vitamine K3), une naphtoquinone générant des EROs mitochondriaux (He *et al.*, 2015; Bajor *et al.*, 2020). Ceci indique donc que la PRDX1 constitue un frein à l'efficacité de molécules pro-oxydantes. Ces augmentations de protéines de détoxification sont intimement liées avec l'activation du facteur de transcription Nrf2 (en anglais « *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2* »). En effet, Nrf2, codé par le gène *NFE2L2*, est connu pour transloquer dans le noyau en réponse à un stress cellulaire et activer l'expression de gènes codant des protéines de détoxification cellulaire (pour

revue (Kansanen *et al.*, 2013)). Yamamori et al ont trouvé une résistance prononcée cellules de la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549 aux irradiations par rayons X (Yamamori *et al.*, 2012) et pouvant être expliquée par une surexpression de *NFE2L2* dans ce type cellulaire (Kweon *et al.*, 2006).



**Figure 25. Relation entre la dynamique mitochondriale et la résistance au stress oxydant.** Les cycles de fusion et fission participent au bon fonctionnement mitochondrial. L'induction d'un stress oxydant modéré génère une fission afin d'envoyer certaines mitochondries en mitophagie. Ce contrôle qualité mitochondrial permet d'éviter l'accumulation de mitochondries endommagées. L'induction d'un stress oxydant sévère par des thérapies anti-cancéreuses entraîne un excès de fission qui prédispose la cellule à la mort cellulaire par apoptose (adapté de (Ježek, Cooper and Strich, 2021)).

La mitochondrie subit des cycles perpétuels de fusion et fission régulés par différents facteurs. Les mitofusines 1 et 2 (Mfn1/2) et la protéine Opa1 (*Optic Atrophy Type 1 protein*) sont impliquées dans la fusion alors que les protéines Fis1 et Drp1 (*Dynammin-Related Protein 1*) le sont dans la fission. Cette dynamique mitochondriale sert de « contrôle qualité » pour assurer un fonctionnement correct de cet organite et éviter la genèse d'un stress cellulaire. Ainsi, des altérations de cette dynamique sont fréquemment rencontrées dans les cancers et intimement liées à la production d'EROs. Par exemple, il a été montré qu'une déficience spécifique de la protéine de fusion Mfn2, menant donc à un excès de fission, est associée à un stress cellulaire important (Muñoz *et al.*, 2013). Récemment, l'augmentation

de Mfn2 dans les cancers pulmonaires non à petites cellules par la dérégulation du facteur AIM2 a été corrélée à une diminution significative d'EROs cellulaires limitant ainsi la genèse d'un stress oxydant (Qi *et al.*, 2020). En revanche, un effet différent a été observé dans des cellules de tumeurs ovariennes où une augmentation de la fission mitochondriale contribue largement à une résistance au cisplatine (Han *et al.*, 2019). Ma et al ont récemment passé en revue l'ensemble des modulation des protéines de fusion/fission et leurs effets sur l'agressivité et la résistance tumorale (Ma, Wang and Jia, 2020). Ni la fusion ni la fission ne sont favorables ou défavorables à un stress oxydant et à une résistance thérapeutique. Bien que certaines études attribuent cette résistance à la fusion et d'autres à la fission, la dynamique mitochondriale est simplement adaptée en fonction du degré de stress oxydant présent. Dans les cancers du sein triple négatifs, le sous-type de tumeur mammaire le plus agressif, il est proposé qu'en réponse à une faible quantité de stress oxydant, une fission mitochondriale modérée conduit à maintenir cette agressivité alors qu'un stress oxydant beaucoup plus important mène à un excès de fission et entraîne la mort cellulaire (figure 25) (pour revue (Weiner-Gorzel and Murphy, 2021)). Autrement dit, la fission est une réponse au stress permettant de renouveler le réservoir de mitochondries et quand elle est activée en excès, la fusion permet d'éviter le déclenchement de l'apoptose. Zhou et al ont remarquablement bien démontré que le traitement de cellules MCF7 et MDA-MB-231 par la liensinine, un inhibiteur de l'autophagie, augmente la fission par un mécanisme dépendant de Drp1 et sensibilise ces lignées à la doxorubicine, au paclitaxel et à la vincristine. Les auteurs de cette étude ont transposé ces résultats dans un modèle de souris Nude ayant des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 et ont montré que l'utilisation de la liensinine permettait une réduction tumorale importante en réponse à la doxorubicine par un mécanisme dépendant de Drp1 (Zhou *et al.*, 2015).

Au-delà de ses rôles dans le noyau et dans certaines voies de signalisation, la protéine tau a été décrite dans certains organites. Dans le processus de neurodégénérescence, des dysfonctionnements mitochondriaux sont systématiquement observés. Par exemple, les neurones de personnes atteintes de tauopathie affichent des altérations de la forme, la localisation et le métabolisme mitochondrial. En complément, des oxydations de protéines, lipides et des bases de l'ADN sont observées (Castellani *et al.*, 1995; Albers and Augood, 2001; Wang *et al.*, 2014; Cabezas-Opazo *et al.*, 2015; Abolhassani *et al.*, 2017). Ces études corrélatives ont établi un lien entre les formes pathologiques de tau et une distribution anormale le long des axones, des cycles de fusion/fission aberrants, une mitophagie défailante ou encore un potentiel de membrane mitochondrial altéré (Wang *et al.*, 2014; Cheng and Bai, 2018a; Zheng *et al.*, 2020). Même si la majeure partie de ces études suggèrent que de telles altérations se produisent parce

que les formes pathologiques de tau sont toxiques pour le neurone, il est également largement suggéré qu'elles sont dues à une perte-de-fonction de protéine tau physiologique. Corroborant ce postulat, quelques études ont trouvé des enrichissements de tau dans les mitochondries (Hu *et al.*, 2016; Cieri *et al.*, 2018). Parmi ces fonctions, le cycle de fusion et fission assuré par les protéines de fusion Opa1, les Mfn1/2 et la protéine de fission Drp1 peut être régulé par la protéine tau. Cet élément est particulièrement intéressant dans la mesure où le bon fonctionnement mitochondrial dépend de cycles de fusion et fission bien régulés. En plus des cycles de fusion et fission, les mitochondries sont également soumises à un trafic intracellulaire. Dans les neurones par exemple, les mitochondries sont enrichies dans l'axone et sont transportées par les microtubules et leurs protéines motiles. La protéine, qui interagit avec les microtubules, la dynéine et la kinésine, intervient dans ce transport. En effet, plusieurs études ont lié la perte de tau avec des altérations du transport des mitochondries. De manière intéressante, ces défauts de transport corroborent avec la formation d'un stress oxydant responsable en partie du processus de dégénérescence neuronal. En présence de la protéine tau, plusieurs travaux, dont certains ont utilisé des lignées de cellules cancéreuses comme les HeLa, ont montré que les mitochondries se retrouvaient dans une région périnucléaire du noyau (Stamer *et al.*, 2002; DuBoff, Götz and Feany, 2012; Hu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Cieri *et al.*, 2018). Dans les cancers, il a été montré que ce regroupement périnucléaire des mitochondries pouvait avoir des conséquences sur la résistance des cellules cancéreuses à l'hypoxie et à la formation de l'angiogenèse (Al-Mehdi *et al.*, 2012). Un autre effet de tau au niveau mitochondrial et pouvant contribuer à la régulation du stress oxydant a été démontré par Cieri et ses collaborateurs. Dans leur étude, les auteurs ont montré qu'une protéine tau wt ainsi qu'une de ses formes pathologiques étaient retrouvées dans la mitochondrie, précisément sur sa membrane externe (OMM, *Outer Mitochondrial Membrane*) et dans son espace intermembranaire (IMS, *Inner Membrane Space*). Alors que les contacts entre la mitochondrie et le RE sont maintenus pour la protéine tau wt, ils sont altérés avec la protéine tau pathologique. Ceci indique que tau wt possède une fonction dans le maintien du contact mitochondrie-RE. Ces contacts sont d'autant plus importants qu'ils permettent les échanges calciques entre les deux organites. Dans leur étude, les auteurs montrent en effet que la formation d'une tau tronquée est associée à des flux calciques perturbés (Cieri *et al.*, 2018). Ceux-ci mènent alors inéluctablement vers la mort cellulaire par apoptose. Cette étude est appuyée par celle de Atlante *et al.* qui montrent qu'un fragment tronqué de tau, qui mime donc une protéine tau pathologique, est associé à une dérégulation de la chaîne OXPHOS (Atlante *et al.*, 2008). L'ensemble de ces observations indiquent que tau pourrait être une protéine impliquée dans différents aspects du



fonctionnement de la mitochondrie et permettrait de limiter la production d'EROs ou d'augmenter leur détoxification. Notre hypothèse est donc que la protéine tau, dans la cellule cancéreuse, a la capacité de réguler négativement le stress oxydant et constituerait ainsi un facteur de résistance aux chimiothérapies et à la radiothérapie induisant un tel stress.

**Cette hypothèse a été étudiée dans le troisième objectif de cette thèse.**

# **OBJECTIFS**

## OBJECTIFS DE LA THÈSE

Bien que la protéine tau soit principalement étudiée dans les neurones, l'intérêt de l'expression de son gène dans les cancers croît depuis quelques années. Son rôle dans de telles conditions pathologiques a été associé à une résistance aux taxanes (Rouzier *et al.*, 2005; Mimori *et al.*, 2006; Smoter *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013). Grâce aux études réalisées sur tau, nous découvrons que cette protéine n'a pas qu'une seule fonction et n'est pas retrouvée que dans les neurones. L'objectif de cette thèse est alors de mettre en évidence trois nouvelles fonctions de tau impliquées dans la stabilité génomique et le maintien de l'hétérochromatine et de montrer l'impact de tau dans la résistance thérapeutique face à plusieurs traitements anti-cancéreux autres que ceux incluant les taxanes.

1. Objectif 1 : implication de tau dans deux mécanismes de réparation de l'ADN et impact sur la résistance aux DDA et aux rayons X

La découverte de la protéine tau dans le compartiment nucléaire (Loomis *et al.*, 1990) et son association avec la chromatine (Corces *et al.*, 1980a; Villasante *et al.*, 1981; Greenwood and Johnson, 1995) a soulevé la question d'un rôle de tau dans la protection de l'ADN. Quelques études ont montré que la délétion de tau entraînait une accumulation de dommages à l'ADN (Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2014). D'autres études ont confirmé un rôle pour tau dans la stabilité génomique (Lu *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2013; Bou Samra *et al.*, 2017). Toutefois, bien que la plupart de ces études aient proposé que tau adopte une conformation particulière avec l'ADN lui conférant alors une protection, les mécanismes sous-jacents n'ont pas été élucidés.

Habituellement, les cancers affichant à une forte résistance thérapeutique face aux DDA ou à l'irradiation montrent également une activité de réparation de l'ADN plus importante (Khongkow *et al.*, 2013, 2014). En effet, des déplétions de protéines impliquées dans différentes voies DDR ont montré que la réparation des CDB était essentielle dans la résistance à différents traitements thérapeutiques (An *et al.*, 2010; Fridlich *et al.*, 2015; Bhattacharya *et al.*, 2017). De surcroît, bien que une grande partie des cancers possèdent des mutations perte de fonction dans plusieurs gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, elles ne sont pas totalement dépourvues d'activité NHEJ ou HR (Mao *et al.*, 2008a; Sakai *et al.*, 2008). Ainsi, une surexpression de gènes codant des protéines de réparation de l'ADN constitue un obstacle à l'efficacité de certaines chimiothérapies et de la radiothérapie.

**Le premier objectif de cette thèse est de montrer dans un premier temps que la nature de la protection génomique apportée par tau est expliquée par une meilleure activité de réparation de l'ADN. Dans un second temps, il est de montrer que cette activité de réparation de l'ADN est retrouvée dans des cellules cancéreuses et constitue une résistance à des chimiothérapies à base de bléomycine (*in cellulo*) et à la doxorubicine (*in vivo*) et à la radiothérapie (rayons X). L'objectif sous-jacent est de montrer que la délétion de *MAPT* permet de resensibiliser les cellules cancéreuses aux traitements inducteurs de dommages à l'ADN et constitue alors une piste thérapeutique.**

## 2. Objectif 2 : effet de tau sur le maintien de l'hétérochromatine et résistance aux inhibiteurs de HDAC

Plusieurs études ont montré que la protéine tau jouait un rôle prépondérant dans l'organisation de la chromatine. Plus précisément, son rôle dans le maintien de l'hétérochromatine est devenu évident aux vues des travaux qui ont démontré une désorganisation chromatiniennne dans les neurones de patients atteints de la MA. La conséquence d'une telle perte de structure locale de la chromatine est une réexpression aberrante de gènes, notamment impliqués dans le cycle cellulaire ou la mort cellulaire (Frost, Hemberg, Lewis and Mel B. Feany, 2014). Cette relaxation a été associée à la perte de fonction physiologique de tau. Cependant, les mécanismes exacts par lesquels la protéine tau maintient l'hétérochromatine et l'organisation générale de la chromatine ne sont pas totalement élucidés. De plus, l'impact de cette fonction sur l'efficacité d'épidrogues n'a jamais été étudié.

Ces dernières décennies, plusieurs molécules pouvant moduler certains mécanismes épigénétiques ont émergé. Parmi eux, les inhibiteurs de HDAC ont prouvé leur efficacité dans les cancers hématologiques et une efficacité relative dans les cancers solides. La présence de nombreux mécanismes de résistance obligerait à les employer à des concentrations élevées. De plus, l'apparition d'effets secondaires importants ne permet pas de les utiliser à des concentrations thérapeutiques et limite ainsi leur utilisation (Shah, 2019).

**Le deuxième objectif de cette thèse est, d'une part, de décortiquer le rôle de tau dans le maintien de la structure de la chromatine et, d'autre part, de montrer que cette fonction limite l'efficacité d'un inhibiteur de HDAC, la TSA, dans des lignées cellulaires de différentes tumeurs. L'objectif**

**sous-jacent ici est également de montrer que le ciblage de tau dans ces cellules pourrait améliorer les traitements à base d'inhibiteurs de HDAC.**

3. Objectif 3 : effet de tau sur la prévention du stress oxydant et implication dans la résistance à plusieurs traitements

La majorité des maladies neurodégénératives est caractérisée par de forts taux de stress oxydant (Barnham, Masters and Bush, 2004). Dans les cellules présentant des altérations de tau, ce type de stress est également retrouvé soulevant ainsi la question du lien entre la protéine tau et le stress oxydant (Castellani *et al.*, 1995; Albers and Augood, 2001; Cabezas-Opazo *et al.*, 2015; Abolhassani *et al.*, 2017). Dès lors, beaucoup ont lié la formation de protéines tau pathologiques avec des altérations de la mitochondrie, le principal lieu de production d'EROs intracellulaire (Wang *et al.*, 2014; Cheng and Bai, 2018a; Zheng *et al.*, 2020). À ce jour, aucune étude n'a cependant réellement prouvé que la protéine tau était douée de réduction ou de prévention d'un tel stress.

Bien que les molécules thérapeutiques utilisées dans le traitement des cancers aient leur mécanisme propre, la majeure partie d'entre elles génèrent un stress oxydant. C'est le cas notamment des chimiothérapies à base de taxanes (Meshkini and Yazdanparast, 2012; Ren *et al.*, 2018), d'anthracyclines (Davies and Doroshow, 1986; Doroshow and Davies, 1986; Kalivendi *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2010), d'inhibiteurs de HDAC (Rosato *et al.*, 2008; El-Naggar *et al.*, 2019) ou encore d'irradiation (Kernbaum, 1909; Leach *et al.*, 2001; Dayal *et al.*, 2008; Barjaktarovic *et al.*, 2011). Ainsi, la toxicité de ces traitements est également apportée par l'augmentation d'EROs. Les cellules cancéreuses possèdent la particularité d'avoir des niveaux de stress oxydant beaucoup plus importants que leurs homologues saines (Trachootham, Alexandre and Huang, 2009; Liou and Storz, 2010). Une des stratégies en thérapie est donc d'exploiter cette caractéristique particulière en induisant un stress oxydant généralisé. Les cellules cancéreuses atteindront alors plus facilement un seuil de mort cellulaire mais pas les cellules saines (Trachootham, Alexandre and Huang, 2009). Seulement, si l'effet protecteur de la protéine tau face au stress oxydant observé dans les neurones est également vrai dans des cellules cancéreuses sous traitement, ces dernières exhiberaient des niveaux de stress similaires aux cellules saines et cette stratégie s'avérerait inefficace.

**Le troisième objectif de cette thèse est donc de démontrer que la protéine tau préserve les cellules cancéreuses d'une accumulation d'EROs et les protège des différents traitements thérapeutiques inducteurs de stress oxydant et d'en décrypter les mécanismes. À l'instar des deux premiers objectifs, l'objectif sous-jacent de cette dernière partie est de souligner l'importance de réprimer l'expression de *MAPT* ou de cibler la protéine tau afin d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements induisant un stress oxydant.**

## DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

Modèles *in cellulo* : nous avons choisi des lignées cellulaires de tumeurs mammaires pour évaluer le rôle de tau dans la résistance thérapeutique à l'irradiation et aux agents de chimiothérapie endommageant l'ADN. Ce choix de ce type de tumeur est basé sur la littérature où la protéine tau a été premièrement associée à une résistance aux taxanes (Rouzier *et al.*, 2005) et reprises dans d'autres études (Ikeda *et al.*, 2010a; Bonneau *et al.*, 2015).

Modèle *in vivo* : nous avons choisi de vérifier nos résultats *in vivo* dans un modèle de souris immunodéficientes SCID, fréquemment utilisé en cancérologie. Nos cellules étant d'origine humaine, nous avons choisi des souris immunodéficientes (SCID) pour éviter toute forme de rejet. Enfin, notre centre de recherche possède l'expertise, les locaux et le personnel à proximité pour réaliser des expérimentations sur ce modèle.

# RÉSULTATS



**Étude 1** : implication de la protéine tau dans les mécanismes de réparation de l'ADN dans les cancers et résistance aux DDA et à la radiothérapie

## **Implication de la protéine tau dans les mécanismes de réparation de l'ADN dans les cancers**

Thomas Rico, Raphaëlle Caillierez, Thomas Comptdaer, Éric Adriaenssens, Luc Buée, Bruno Lefebvre

### Résumé :

La résistance thérapeutique est un des enjeux majeurs dans le traitement des cancers. Ces derniers peuvent être intrinsèquement résistants ou cette résistance peut être acquise pendant le traitement. Dans ce contexte, la protéine tau, codée par le gène *MAPT*, pourrait s'avérer être un contributeur important dans la résistance aux thérapies anti-cancéreuses. Initialement décrite au niveau neuronal, une littérature abondante a maintenant démontré que l'expression de son gène est augmentée dans plusieurs types de cancers et pouvait être associée à une résistance aux taxanes. Cet effet a été associé à son rôle bien connu de régulatrice de l'assemblage et désassemblage des microtubules. Cependant, des travaux récents ont montré, au niveau neuronal, que tau était une protéine pléiotrope, impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires. Parmi eux, son rôle dans la protection/réparation du génome pourrait être directement lié à une résistance à d'autres traitements anti-cancéreux, notamment ceux induisant des dommages à l'ADN. Nos résultats montrent que les CDB de l'ADN disparaissent plus rapidement après une irradiation ou un traitement à la bléomycine dans des cellules MCF7 et MDA-MB-231 exprimant *MAPT* de manière endogène que dans leurs homologues transfectés stablement avec un shRNA dirigé contre tau (shTau). Cette observation a été liée à une augmentation des activités de réparation des CDB de type jonction des extrémités non-homologues (NHEJ) et de recombinaison homologue (HR). Nous avons pu expliquer ce nouveau rôle de tau par sa capacité à augmenter le trafic microtubulaire de la protéine 53BP1, un facteur essentiel dans l'initiation de la réparation, améliorant donc sa translocation nucléaire. Ces résultats ont été testés *in vivo* en utilisant un modèle de souris immunodéficientes (SCID) xéno greffées. Nous avons pu ainsi confirmer *in vivo* que la protéine tau était un facteur de résistance à la radiothérapie et la chimiothérapie induisant des CDB (doxorubicine) et que la diminution de son expression par shRNA augmentait la sensibilité des tumeurs à ces traitements.

## 1. Introduction

Bien qu'initialement décrite au niveau neuronal, l'expression de *MAPT* a été maintenant retrouvée dans plusieurs tissus périphériques en conditions physiologiques et pathologiques. En effet, la protéine tau est retrouvée dans plusieurs cancers tels que les carcinomes mammaires, ovariens, prostatiques ou encore gastriques (Rouzier *et al.*, 2005; Smoter *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Schroeder *et al.*, 2019). Dans ces cancers, la fonction microtubulaire de tau a été associée à la résistance aux taxanes. Toutefois, grâce aux études réalisées sur les tauopathies dont la MA, il est admis que la protéine tau possède plusieurs fonctions cellulaires autres que sa fonction microtubulaire qu'on lui connaît. Notamment, une relation a été établie entre la déplétion de tau (modèles *in vivo* KO-tau) ou la présence de formes pathologiques de tau et l'apparition et la persistance de dommages double brin de l'ADN (Sultan *et al.*, 2011 ; Violet *et al.*, 2014). L'hypothèse consensuelle suggère que tau lie la séquence d'ADN et permet la formation d'une conformation spécifique empêchant la formation du dommage (Hua and He, 2003; Hua *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2008b). Toutefois, aucune étude *in vivo* n'a démontré une telle conformation dans la protection du génome. Notre hypothèse est que la protéine tau pourrait intervenir directement dans la voie DDR et ainsi améliorer les systèmes de réparation.

L'objectif de cette étude est, dans un premier temps, de caractériser la sensibilité de cellules tumorales exprimant tau ou déplétées en tau aux thérapies induisant des dommages à l'ADN. Pour cela, nous avons réalisé des traitements de chimiothérapie utilisant la bléomycine (tests *in cellulo*) ou la doxorubicine (tests *in vivo*) ainsi que des traitements de radiothérapie (rayons X). Dans un second temps, l'effet de tau sur deux mécanismes de réparation de l'ADN est étudié. Enfin, les mécanismes moléculaires impliquant cet effet sur ces mécanismes de réparation de l'ADN seront caractérisés.

## 2. Matériel et méthodes

### a. Culture cellulaire, transfections et traitements

Les cellules des lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF7, la lignée de cancer du col de l'utérus HeLa et de neuroblastome humain SH-SY5Y ont été obtenues par le fournisseur ATCC et sont

cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) supplémenté de pénicilline (100U/ml), streptomycine (100 g/ml), sérum de veau fœtal (10%) et AA non-essentiels (1%). Les cellules de la lignée HCC1954 et CHO-K1 obtenues chez ATCC sont cultivées dans du milieu RPMI1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*, Gibco) supplémenté de pénicilline (100U/ml), streptomycine (100 g/ml) et sérum de veau fœtal (10%).

Les plasmides GFP (Addgene, #13031), Tau-GFP, Tau, mCherry (Addgene, #20956), I-SceI (Addgene, #60960) sont transfectés par lipofectamine (Lipofectamine 3000 Reagent, Invitrogen) comme agent de transfection lorsque les cellules atteignent environ 60% de confluence. Pour les transfections, des cellules HeLa sont cultivées dans une plaque de 6 puits, pour l'établissement des clones stables pDR GFP (Pierce *et al.*, 1999) et pimeJ5GFP (Bennardo *et al.*, 2008), dans un milieu DMEM supplémenté de pénicilline (100U/ml), streptomycine (100 g/ml) et sérum de veau fœtal (10%). Le milieu est retiré et remplacé par un milieu DMEM dépourvue d'antibiotiques (milieu DMEM PS-). Les plasmides pDR GFP et pimeJ5GFP sont transfectées par lipofectamine (Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, ThermoFisher). Une quantité de 3  $\mu$ L de lipo2000 est ajoutée dans 500  $\mu$ L de milieu de culture DMEM sans antibiotique ni sérum. Après 5 minutes d'incubation, une quantité de 1,25  $\mu$ g de plasmide est ajouté à la solution de lipo2000. Après 20 minutes d'incubation, le mélange lipo2000-plasmide est incubé dans le milieu contenant les cellules. Au bout de 24 heures de transfection, le milieu est remplacé et les cellules analysées au bout de 48 heures. Pour les transfections stables, la sélection commence 48 heures après transfection par addition de puromycine (1  $\mu$ g/ml). Après 3 semaines de sélection environ, les clones stables sont repiqués par aspiration dans du milieu DMEM dans des plaques de 24 puits et incubées à 37°C sous atmosphère humide et 5% de CO<sub>2</sub>. Le même protocole de culture et de transfection stable est réalisé sur les cellules SH-SY5Y pour un plasmide possédant un système tétracycline-ON (tetON) en amont de la séquence codante de tau 1N4R, les cellules MCF7 transfectées avec les plasmides shTau (sc-36614-SH, SantaCruz) et shScramble (sc-108060, SantaCruz) ainsi que les cellules CHO-K1 transfectées avec un plasmide codant la séquence codante de la GFP ou une séquence codant une protéine de fusion Tau-GFP.

Les dommages à l'ADN sont obtenus par addition de Bléomycine Sulfate (Calbiochem, Cat : 203401) à une concentration finale de 30  $\mu$ g/ml dans le milieu de culture des cellules MCF7, MDA-MB-231, HCC1954 et HeLa pendant 2 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les dommages induits par rayonnement ionisants sont obtenus par irradiation des lignées cellulaires précédemment décrites à différentes intensités (2, 4

ou 6 Gy) par un accélérateur de particules Clinac23X (photons X 25MV) au centre hospitalier Oscar Lambret.

#### b. Souris SCID, xénogreffes et traitements

Des souris SCID femelles (FOX Chase SCID, Charles River Laboratories) âgées de 6 semaines sont greffées avec la souche sauvage (wt) ou les clones shCtrl et shTau des lignées MCF7 ou MDA-MB-231. Le choix d'un âge précoce des souris a été fait afin de répondre aux besoins en œstrogènes des cellules de la lignée œstrogène-dépendante MCF7. Pour cette lignée, 10 millions de cellules sont injectées dans chacun des deux flancs de la souris en sous-cutanée. Pour la lignée MDA-MB-231, 3 millions de cellules sont injectées selon le même protocole. Les cellules à greffer sont diluées dans une matrice de Matrigel (Corning, 20,6 mg/mL). Un volume de 100  $\mu$ L de Matrigel est dilué dans 100  $\mu$ L de PBS pour une concentration finale de 10,3 mg/mL. Les 200  $\mu$ L de Matrigel dilués sont distribués dans des tubes Eppendorf 1,5 mL et placés à 4°C pour éviter la gélification du Matrigel. Un volume final de 200  $\mu$ L de PBS contenant 2 fois 10 millions de cellules pour la lignée MCF7 et 2 fois 3 millions de cellules pour la lignée MDA-MB-231 est déposé dans les 200  $\mu$ L de Matrigel-PBS préalablement préparés afin d'obtenir la quantité de cellules par tube équivalent aux deux greffes réalisées par souris.

Après injection, la taille des tumeurs est mesurée deux fois par semaine grâce à un pied à coulisse numérique (*electronic digital caliper*). Le volume tumoral exprimé en  $\text{mm}^3$  est obtenu selon la formule :  $L \times l^2 \times 1/2$ . Lorsque les tumeurs ont atteint les 100  $\text{mm}^3$ , les souris sont traitées par chimiothérapie ou radiothérapie. Pour la chimiothérapie, une unique dose de doxorubicine hydrochloride (6 mg/kg) diluée dans du sérum physiologique stérile et injectée par voie intraveineuse (IV). Pour la radiothérapie, les souris sont anesthésiées par kétamine (100 mg/kg) et xylazine (20 mg/kg) et placées dans des boîtes rectangulaires avec plusieurs trous pour permettre la respiration. Les souris sont placées sur le dos de façon à laisser les tumeurs accessibles par les rayons. La zone correspondant aux flancs de chaque souris est irradiée par des rayons X grâce à un appareil de type XRAD320 à une intensité de 2 Gy/jour pendant 2 jours consécutifs. Le suivi de la régression tumorale est réalisé de la même façon que le suivi de la croissance tumorale.

#### c. Fractionnement nucléaires et western blot

Deux millions de cellules des clones MCF7 shCtrl et MCF7 shTau sont ensemencées dans des boîtes de Petri 100-mm et cultivées pendant 48h. Les cellules sont ensuite irradiées à 2 Gy par un accélérateur de particules (ClinacX23) et récupérées par grattage grâce à un râteau 10 minutes post-irradiation. Pour le fractionnement, le culot est lysé par application de 300 µL d'un tampon de lyse *Buffer A* (HEPES 10 mM, pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 1 pastille d'inhibiteur de protéases) à 4°C pendant 15 minutes. À termes, les cellules sont incubées avec 0,1% de NP-40. Un volume de 100 µL du lysat est récupéré et constituera la fraction totale de chaque condition. Les cellules lysées sont immédiatement centrifugées 3000g, 4°C pendant 5 min. Le surnageant correspond à la fraction cytosolique et le culot aux noyaux. Un volume de 200 µL du surnageant est récupéré et constituera la fraction cytosolique. Les culots nucléaires sont ensuite lavés deux fois avec 1 mL du tampon A et centrifugés 3000g, 4°C pendant 5 minutes afin d'éliminer toute trace de protéines cytosoliques. Les culots nucléaires sont ensuite lysés dans 100 µL d'un tampon de lyse *Buffer B* (HEPES 10 mM, pH 7,9, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM). Les fractions totales et nucléaires sont ensuite supplémentées de 0,5 µL de Benzonase Nucléase (Novogen) à température ambiante pendant 30 min. Les échantillons protéiques sont enfin dilués volume à volume dans du tampon de dépôt composé de LDS 4X (Lithium Dodécyl Sulfate, Invitrogen) et de DTT 500 mM (Dithiothreitol, Invitrogen).

Les protéines sont ensuite analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE). Pour cela, les échantillons sont déposés dans des puits de gel réticulé à 4-12% (NuPage, Invitrogen). La migration de ces protéines se fait dans un tampon MOPS 1X (3-morpholino-1-propanesulfonique) SDS Running Buffer (Invitrogen) et sous un voltage constant de 200V pendant 1h. Au terme de cette migration, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose d'une porosité de 0,45 µm (Hybond, GE HealthCare) dans un tampon de migration, sous un voltage constant de 30V pendant 1h15. Afin de vérifier l'efficacité du transfert, une coloration réversible au Rouge Ponceau est réalisée (Acide trichloracétique 3%, Rouge Ponceau 0,2%) dont les spots apparaissent colorés après décoloration à l'eau distillée. On procède ensuite à un lavage de la membrane au TNT (Tris-HCl 100 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) jusqu'à décoloration complète. La saturation des sites aspécifiques est réalisée par l'incubation de la membrane de nitrocellulose dans une solution de TNT supplémentée de lait non gras 5% ou de BSA 5% pendant 45 minutes à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire d'intérêt dilué dans l'agent de saturation toute la nuit. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : Tau Cter (Galas *et al.*, 2006, homemade 993-S2 Y16L-2P [427-441], dilué au 1/4000<sup>ème</sup> dans du lait-

TNT 5%) ; Tau Nter (Galas *et al.*, 2006, homemade 12-41 1242075, dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du lait-TNT 5%) ; 53BP1 (Cell Signaling, dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du lait-TNT 5%), H3 (Milipore, dilué au 1/10 000<sup>ème</sup> dans du lait-TNT 5%) ; Hsp90 (SantaCruz, dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du lait-TNT 5%). Les membranes sont ensuite rincées par 3 lavages de 10 minutes au TNT, afin d'éliminer les anticorps primaires non fixés, avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire, couplé à une peroxydase, pendant 1h à température ambiante sous agitation. Une deuxième série de 3 lavages de 10 minutes au TNT est réalisée afin d'éliminer les anticorps secondaires non couplés à leur antigène. La révélation du couplage anticorps primaire/anticorps secondaire est réalisée par l'utilisation de l'ECL (GE HealthCare) qui est peroxydée par l'enzyme. Le signal émis est obtenu par chimioluminescence par un LAS4000 et les données sont analysées par le logiciel ImageJ (graph Las Software Inc, USA).

#### d. Immunocytochimie

Le milieu de culture des cellules des différentes lignées est retiré et les cellules sont lavées avec du PBS préalablement chauffé à 37°C. Celles-ci sont ensuite fixées dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 20 minutes à température ambiante puis rincées dans du PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées par 300 µL d'une solution 0,1% Triton X-100/PBS pendant 10 minutes à température ambiante et placés sous agitation. La saturation est ensuite réalisée dans une solution BSA/PBS à 2% (Bovine Serum Albumine) à température ambiante sous agitation pendant 1 heure. Les anticorps primaire  $\gamma$ H2AX (Phospho-H2AX Ser139, Millipore lot 2854975, dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans de la BSA-PBS 2%) ; 53BP1 (Cell Signaling, dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans de la BSA-PBS 2%) ; tubuline gamma (Milipore, dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans de la BSA-PBS 2%) sont incubés sur les cellules pendant une nuit à 4°C. Trois lavages sont ensuite réalisés dans du PBS. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps secondaires couplés à un fluochrome (Alexa Fluo 488 nm pour le vert et Alexa Fluo 568 nm pour le rouge) dilué au 1/400<sup>ème</sup> dans du PBS pendant 45 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont rincées 3 fois au PBS et montées entre lame et lamelles dans un milieu de montage Vectashield contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) pour le marquage des noyaux (Vector). L'analyse des lames est réalisée par un microscope confocal de type Spinning Disk (Zeiss).

Les images obtenues par microscopie confocale sont quantifiées grâce au logiciel Fiji – ImageJ. Un programme informatique (macro) a été utilisé pour délimiter dans un premier temps les noyaux grâce à la fluorescence du DAPI. Dans un second temps, elle permet d'identifier au sein de ces noyaux des

zones dans lesquelles l'intensité de fluorescence correspondant au marquage des CDB est au-dessus du bruit de fond. Chacune de ces zones est considérée comme un foyer de CDB. La macro permet alors de quantifier le nombre de foyers d'endommagement d'ADN par noyau.

#### e. Cytométrie de flux

Les clones stables HeLa pDR GFP et pimEJ5GFP sontensemencées dans des plaques 6 puits à 80% de confluence soit environ  $1 \times 10^6$  cellules par puit et transfectées après 24 heures avec un plasmide codant l'enzyme de restriction I-SceI avec ou sans un plasmide codant tau en utilisant le protocole de transfection décrit précédemment. 48 heures après la transfection, les cellules sont décollées à la trypsine et lavées 1 fois (centrifugation 300xg, 5 min, 4°C). Les cellules sont resuspendues dans du PBS et la fluorescence GFP analysée en cytométrie de flux (LSR FORTESSA X20, analyseur BD).

#### f. RT-qPCR

Les ARN sont récupérés grâce au kit RNeasyMinikit (Qiagen). La transcription inverse est réalisée grâce à l'utilisation d'amorces aléatoires selon les recommandations du fournisseur (Applied Biosystems). Les ADN complémentaires (cDNA) sont analysés par PCR selon la méthode TaqMan PCR master mix (Applied Biosystems). Les primers utilisés sont les suivants MAPT (Hs00213484\_m1) et GusB (Hs00939627\_m1) comme gène de référence. Les réactions (40 cycles) et l'analyse des données sont réalisées par ABI Prism 7700 (PerkinElmer).

#### g. ELISA

Les niveaux protéiques de tau dans les cellules MCF7 ont été mesurés en utilisant une dilution en série de lysats cellulaires grâce à un kit ELISA (homemade). Les échantillons protéiques de MCF7 wt, shContrôle et shTau sont préparés selon ce protocole : les cellules sont lysées dans 100  $\mu$ L de tampon RIPA (NaCl 150 mM ; NP40 1% ; sodium déoxycholate 0,5% ; SDS 0,1% ; Tris-HCl 50 mM ; pH 8 et complété avec des inhibiteurs de protéases) puis dans un bain de sonication. Un coating est préparé sur une plaque de 96-puits (Maxisorp F8 ; Nunc, Inc.) toute la nuit à 4°C avec 100 ng par puit de notre

anticorps maison 9H12 (homemade, reconnaissant la partie centrale de tau) dans un tampon carbonate (NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, pH 9,6). Après 5 lavages au PBS supplémenté de 0,05% de Tween (PBS-T), la saturation est obtenue par l'utilisation de 200 µL de tampon de lavage avec 2% de caséine pendant 1 heure à 37°C. Après 5 lavages avec le tampon PBS-T, 50 µL des lysats protéiques dilués dans un tampon PBS-caséine-Tween (PCT) sont incubés 1 heure à 37°C. La gamme étalon contenant une protéine tau 1N4R recombinante est également incubée. Puis, 50 µL d'anticorps de détection (anticorps homemade TauE13N (7F5)) dilué au 1/1000 dans le tampon PCT sont incubé à température ambiante toute la nuit. Après 5 lavages avec le PBS-T, des anticorps secondaires anti-souris IgG1 dilués au 1/32000 sont incubés. Puis, une pastille de tétraméthyle benzidine (TMB) est diluée dans un tampon citrate/phosphate supplémenté de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/5000. Un volume de 100 µL de la solution TMB est incubé sur les substrats. La réaction est ensuite arrêtée par addition de 50 µL d'acide sulfurique. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre (Multiskan Ascent, Thermo Labsystem) à une longueur d'onde de 450 nm.

#### h. Test Hprt et stabilité génomique

L'évaluation de la fréquence de mutations (MF) a été obtenue selon la méthode décrite dans la littérature (Silva *et al.*, 2005). Des cellules CHO-K1 transfectées stablement avec les plasmides codant la GFP ou Tau-GFP sont cultivées dans un premier temps dans un milieu HAT (hypoxanthine) (H0262-10VL, Sigma) pendant 5 jours afin d'éliminer les potentiels mutants *Hprt*<sup>-/-</sup>. Un total de 1,5 millions de cellules estensemencé dans quatre flasques de 75 cm<sup>2</sup> pour chaque condition : PBS, cisplatine (C2210000, Sigma), oxaliplatine (O9512, Sigma) et irradiation (4 Gy). Les cellules sont alors traitées avec le cisplatine (10 µM, 2h), l'oxaliplatine (20 µM, 2h) ou par rayons X (4 Gy). Les cellules sont maintenues en culture après ces traitements pendant 8 jours afin de permettre l'expression du phénotype mutant *Hprt*. À termes, un total de 200 000 cellules sontensemencées en boîtes de 100 mm dans un milieu de culture supplémenté de 6-thioguanine (6-TG, 6 µg/ml) (A4882, Sigma) et cultivées 14 jours afin de sélectionner les mutants *Hprt*. Un total de 200 cellules viables estensemencé en boîte de 35 mm dans un milieu de culture non supplémenté de 6-TG afin de déterminer la viabilité cellulaire après traitements. A l'issu de ces 14 jours, les colonies sont fixées à l'éthanol 70°C et colorées au Giemsa (4%). L'efficacité de clonage (CE, *Cloning efficiency*) est exprimée par le ratio entre le nombre de colonies formées sur le nombre cellulesensemencées. La fréquence de mutations (MF) est le résultat du ratio



entre le CE des cellules cultivées dans le milieu 6-TG + (mutants *Hprt*) et le CE des cellules cultivées dans le milieu 6-TG -.

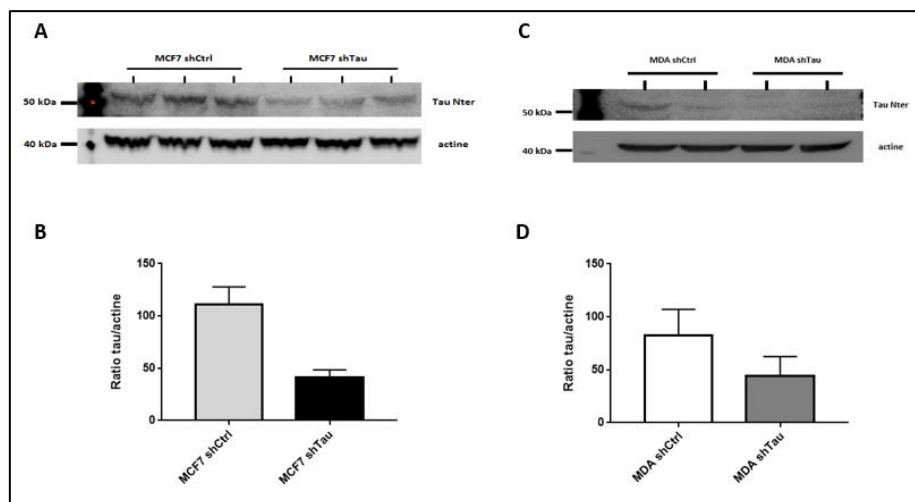
### i. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des expériences de cette étude sont exprimées sous la forme de la moyenne des valeurs de chaque groupe testé et de l'erreur-type de cette moyenne. Ce travail a donné lieu à l'utilisation de trois différents tests : le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, l'ANOVA univarié et le test de Kruskal-Wallis. Les statistiques ont été obtenues grâce au logiciel GraphPad Prism.

## 3. Résultats

### a. Expression et extinction de tau dans deux lignées de tumeurs mammaires

Les cellules MCF7 et MDA-MB-231 ont été transfectées stablement avec un shRNA scramble (shCtrl) shRNA dirigé contre l'ARNm de *MAPT* (shTau) et la quantité protéique et d'ARNm a été évaluée par western blot et qPCR, respectivement (figure 1A et 1C).

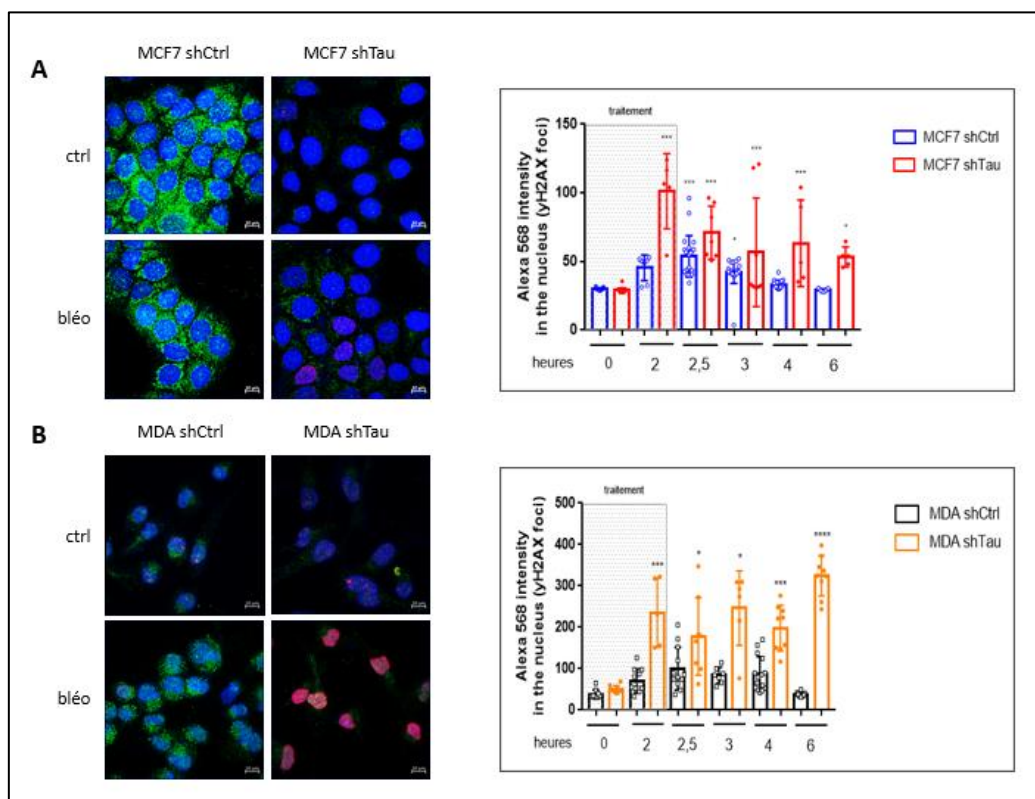


**Figure 1. Expression de *MAPT* dans deux lignées de tumeurs mammaires.** L'expression de *MAPT* a été déterminée par western blot (A) dans les MCF7 shCtrl et shTau et (B) dans les MDA-MB-231 shCtrl et shTau grâce à un anticorps Tau Nter. La quantification relative de la quantité de protéine tau normalisée sur la quantité d'actine dans les deux clones est représentée (C) pour les MCF7 et (D) pour les MDA-MB-231.

Les résultats du western blot montrent que la quantité protéique de tau est diminuée de 62,7% en présence du shTau en comparaison avec le shCtrl dans les cellules MCF7 (figure 1B) et de 56,2% dans les MDA-MB-231 (figure 1D). Une analyse complémentaire ELISA confirme les résultats obtenus par western blot et, en raison de son caractère quantitatif, permettent de déterminer que la quantité de protéines tau est diminuée d'environ 73,8% dans les MCF7 shTau par rapport aux MCF7 wt et shCtrl (figure supplémentaire 1A). Enfin, l'ARNm de *MAPT* a été déterminée par RT-qPCR et montre également une diminution de 60,4% dans les shTau en comparaison avec les shCtrl (figure supplémentaire 1B).

### b. Effet de la protéine tau sur la réponse aux dommages à l'ADN

Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre le rôle de tau sur la protection/réparation de l'ADN. Pour cela, une première approche expérimentale a consisté à déterminer la quantité de CDB par immunocytochimie, modélisée par la présence de  $\gamma$ H2AX.



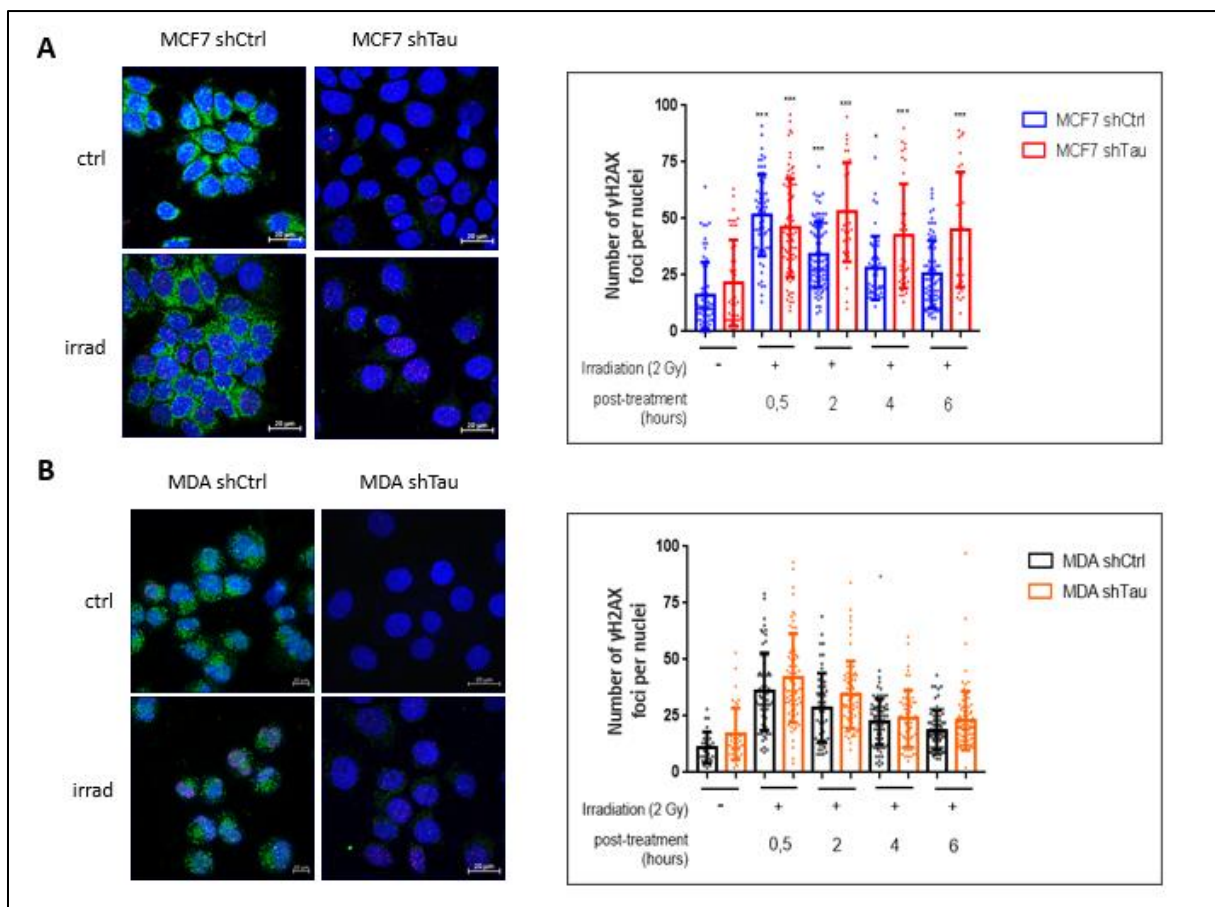
**Figure 2. Évolution des CDB après un traitement à base de bléomycine.** Les clones stables des cellules MCF7 shCtrl et shTau et MDA-MB-231 shCtrl et shTau ont été traitées à la bléomycine (30  $\mu$ g/ $\mu$ l, 2h) fixées et analysées par immunocytochimie (ICC). Les acquisitions représentatives de l'évolution des CDB modélisée par

la présence de l'histone H2AX phosphorylée sur la sérine 139 ( $\gamma$ H2AX) en rouge (Alexa 568) sont représentées et quantifiées (A) pour les clones MCF7 et (B) pour les clones MDA-MB-231. La protéine tau est représentée en vert (Alexa 488). Les images représentent les cellules contrôles et 6h après le début des traitements. Test statistique : One-way ANOVA.

Les cellules MCF7 et MDA-MB-231 shCtrl et shTau ont été traitées à la bléomycine (30  $\mu$ g/ $\mu$ l, 2h) puis fixées immédiatement ou 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 4 heures après le traitement (2 heures, 2,5 heures, 3 heures, 4 heures et 6 heures sur la figure). La quantité de CDB a été modélisée par la présence de la protéine  $\gamma$ H2AX dans les noyaux. Les résultats obtenus ne montrent pas de différences de CDB entre les shCtrl et shTau pour les cellules MCF7 et MDA-MB-231 en conditions basales. En revanche, les MCF7 shTau et MDA-MB-231 shTau ont respectivement 2,5 et 2,8 fois plus de CDB que les MCF7 shCtrl et MDA-MB-231 shCtrl après 2 heures de traitement à la bléomycine (figure 2). En suivant l'évolution de ces dernières à 30 min, 1 heure, 2 heures et 4 heures après la fin des 2 heures de traitement, nous avons remarqué que les MCF7 shTau avaient toujours respectivement 1,5 ; 1,5 ; 2,2 et 2,3 fois plus de CDB que dans les MCF7 shCtrl. Après 6 heures, les MCF7 shTau affichent toujours 2,3 fois plus de CDB qu'en conditions basales alors que les MCF7 shCtrl retrouvent leur niveau d'origine (figure 2A). Pour les MDA-MB-231 shTau, nous obtenons des résultats similaires. En effet, nous trouvons 1,8 ; 2,5 ; 2 et 5,9 fois plus de CDB que les MDA-MB-231 shCtrl. De la même façon, les shTau gardent 5,9 fois plus de CDB 6 heures après l'induction des premiers dommages par la bléomycine alors que les MDA-MB-231 shCtrl retrouvent leur niveau basal (figure 2B). Autrement dit, cette cinétique post-traitement montre que l'expression de tau est associée à une disparition plus rapide des dommages.

Afin de préciser le rôle de tau dans ce mécanisme, nous avons réalisé une cinétique après induction de CDB par rayons X. Grâce à ce type de traitement, nous pouvons évaluer l'évolution des CDB dès les premières minutes post-traitement. Les résultats obtenus montrent que dans les 30 premières minutes post-traitement, les rayons X génèrent autant de CDB dans les MCF7 shCtrl que dans les MCF7 shTau (2,9 fois et 2,5 fois, respectivement). En revanche, entre cette première demi-heure et 2 heures post-irradiation, la quantité de CDB dans les MCF7 shCtrl diminue d'environ 36% alors que dans les shTau elle augmente de 15,1% dans les MCF7 shTau. La suite de la cinétique de réparation de l'ADN montre que la quantité de CDB dans les MCF7 shTau à 4 heures et 6 heures après irradiation est respectivement de 2,3 et 2,5 fois supérieure aux conditions basales alors qu'elle est respectivement de 1,6 fois et 1,3 fois supérieure pour les MCF7 shCtrl (figure 3A). Pour les MDA-MB-231, l'irradiation génère 2,7 fois

plus de CDB à la fois dans les MDA-MB-231 shCtrl et shTau. Nous obtenons donc une induction de CDB par les rayons X similaire aux MCF7 sans différences entre les shCtrl et shTau pendant la première demie heure post-traitement. La suite de la cinétique de réparation de l'ADN montre que la quantité de CDB dans les MDA-MB-231 shTau à 2, 4 et 6 heures après irradiation est respectivement de 1,2 fois, identique et 1,3 fois supérieure aux MDA-MB-231 shCtrl (figure 3B). Les résultats obtenus montrent qu'après un traitement aux rayons X, la même quantité de CDB est observée (figure 3). Cette observation semble incompatible avec l'hypothèse d'une protection physique de l'ADN.



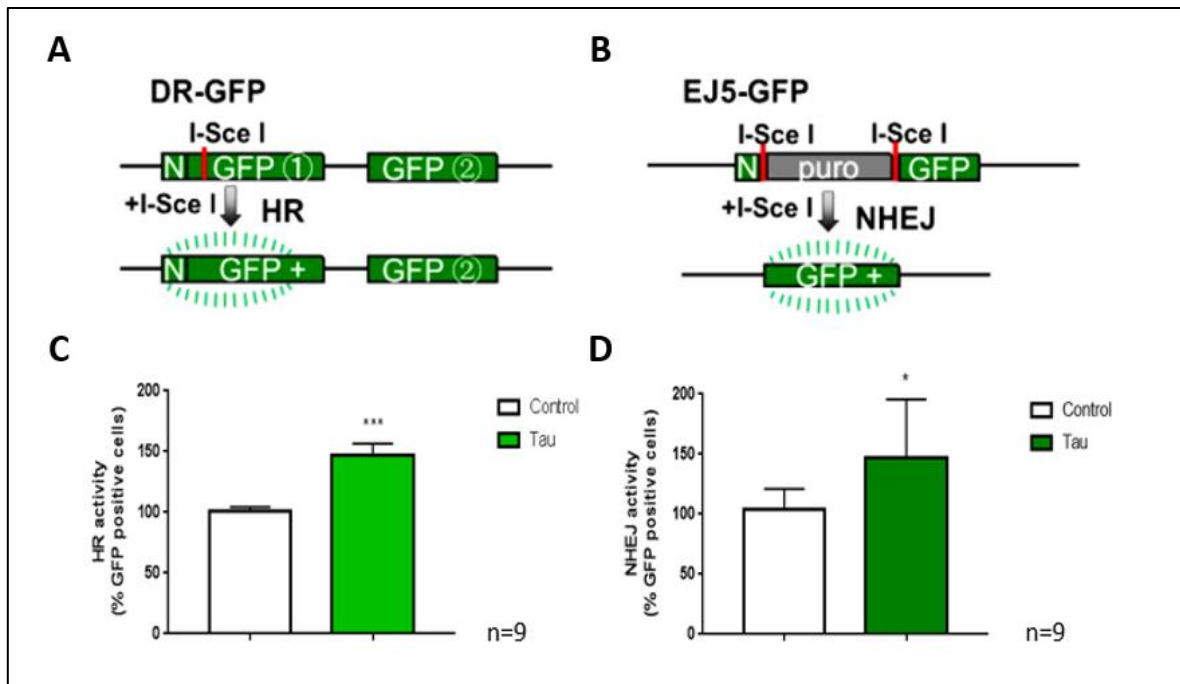
**Figure 3. Évolution des CDB après un traitement à base de rayons X.** Les clones stables des cellules MCF7 shCtrl et shTau et MDA-MB-231 shCtrl et shTau ont été traitées aux rayons X (2 Gy) fixées et analysées par immunocytochimie (ICC). Les acquisitions représentatives de l'évolution des CDB modélisée par la présence de l'histone H2AX phosphorylée sur la sérine 139 ( $\gamma$ H2AX) en rouge (Alexa 568) sont représentées et quantifiées (A) pour les clones MCF7 et (B) pour les clones MDA-MB-231. La protéine tau est représentée en vert (Alexa 488). Les images représentent les cellules contrôles et 6h après le début des traitements. Test statistique : One-way ANOVA.

D'un point de vue mécanistique, une protection physique suppose également une augmentation de la liaison de tau à la chromatine lors d'un traitement à base de DDA afin de répondre à l'accumulation des CDB. Nous avons donc réalisé un fractionnement biochimique en utilisant des concentrations croissantes en NaCl qui permettent d'extraire les protéines présentes dans les fractions de plus en plus insolubles du noyau. Ainsi, des cellules de la lignée SH-SY5Y tetON en amont de la séquence codante de la protéine tau 1N4R ont été soumises à différents traitements : bléomycine sulfate (radiomimétique), étoposide (inhibiteur de topoisomérase II de type épipodophyllotoxine), et peroxyde d'hydrogène ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dommages oxydatifs) après induction à la tétracycline. La présence de protéines tau dans les différentes fractions nucléaires a été déterminée en western blot grâce à un anticorps Tau Cter. Les résultats obtenus montrent que la protéine tau est retrouvée dans les fractions nucléaires solubles de 100 mM et 300 mM en NaCl et très peu retrouvée dans les fractions à 600 mM et 900 mM en NaCl. De manière intéressante, ces trois différents traitements n'induisent pas de transfert de tau des fractions solubles vers les fractions insolubles. Autrement dit, l'induction de dommages par ces différents DDA n'entraîne pas d'augmentation de la liaison de tau à la chromatine (figure supplémentaire 2). Ces résultats montrent que l'effet de tau en réponse à la bléomycine n'est pas que dû à une liaison de tau à l'ADN et à une protection physique. Les cinétiques de réparation montrent que l'expression de tau est corrélée à une réparation des CDB plus efficaces après un traitement à la bléomycine et aux rayons X (figure 2 et figure 3).

### c. Effets de tau sur la NHEJ et la HR

Les CDB étant réparées par NHEJ et HR, nous avons vérifié l'effet de tau sur ces deux mécanismes de réparation. Pour cela, nous avons utilisé des cellules HeLa transfectées stablement avec les systèmes rapporteurs DR GFP (figure 4A) et EJ5-GFP (figure 4B) permettant d'évaluer l'activité de HR et de NHEJ, respectivement. Dans ces systèmes rapporteurs se trouve la séquence codante de la GFP. Dans le système DR GFP, la GFP possède une délétion de 22 pb flanquée par les sites de restriction de l'endonucléase I-SceI (GFP 1 sur la figure). La séquence de 22 pb délétée se trouve en aval de cette construction (GFP 2 sur la figure) et est tronquée en 5'-3' ce qui permet la conversion génique sans crossing-over. La transfection transitoire d'un plasmide codant I-SceI permet de générer une CDB au niveau de la délétion. Une recombinaison de la GFP 1 avec la séquence GFP 2 permet de réparer la CDB et permettre l'expression de la GFP. Dans le système EJ5-GFP, un intron flanqué des sites de restriction

de l'enzyme I-SceI se trouve au sein de la séquence codante de la GFP. La transfection transitoire du plasmide I-SceI permet le retrait de cet intron et génère une CDB avec des extrémités compatibles. La réparation de cette CDB par NHEJ permet de reconstituer la GFP. Ces cellules HeLa DR-GFP et HeLa EJ5-GFP ont alors été cotransfectées transitoirement avec le plasmide I-SceI et un plasmide contenant la séquence codante de tau 1N4R. La fluorescence de la GFP a été analysée par cytométrie de flux et les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (la condition contrôle est ramenée à 100%).

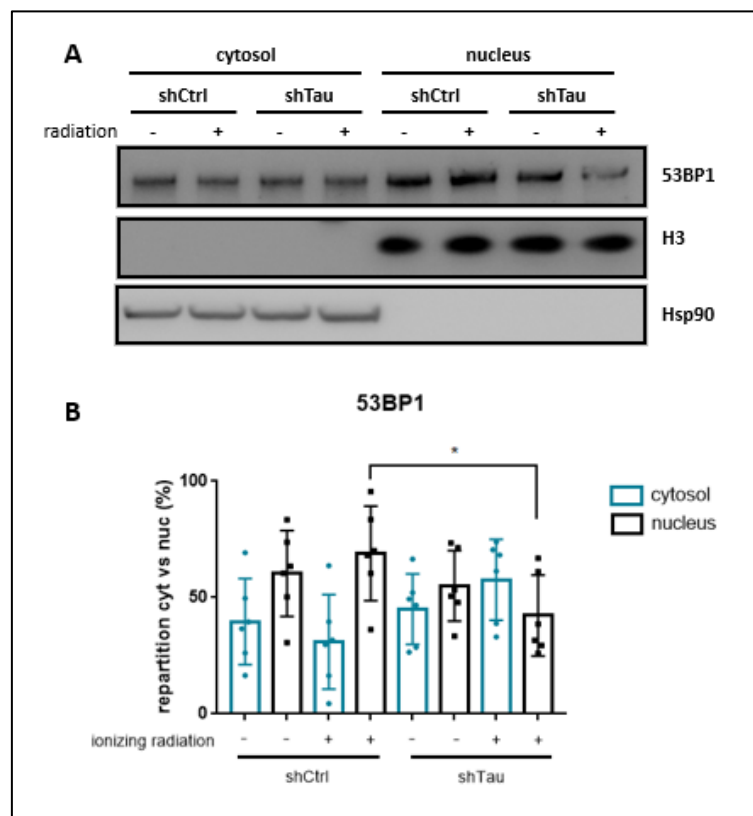


**Figure 4. Détection de la réparation NHEJ dans des cellules HeLa transfectées ou non avec tau par cytométrie de flux.** Les clones stables (A) pDR GFP et (B) pimEJ5GFP sont transfectés stablement dans des cellules HeLa. (C) L'activité HR et (D) NHEJ sont quantifiées par la moyenne  $\pm$  SD du % de cellules de 9 expériences indépendantes. Test statistique : Mann-Whitney.

Les résultats obtenus montrent que l'expression de tau est associée à une augmentation significative de 1,5 fois de l'activité HR (figure 4C) et de l'activité NHEJ (figure 4D). Ainsi, la présence de la protéine stimule les activités de réparation des CDB de type HR et NHEJ et expliquent l'efficacité plus importante des cinétiques de réparation de l'ADN dans les cellules tau-positives (figure 2 et figure 3).

d. Différences de translocation nucléaire de la protéine 53BP1

L'induction de CDB par différents traitements implique l'activation de la voie DDR. Celle-ci déclenche la NHEJ ou la HR en favorisant respectivement les protéines 53BP1 ou BRCA1. Les résultats de cinétique de réparation obtenus précédemment (figure 2 et figure 3) montrent que celle-ci s'opère pour les MCF7 shCtrl et MDA-MB-231 shCtrl entre 30 minutes et 2 heures après l'induction de dommages. Ces temps relativement courts suggèrent une réparation courte de type NHEJ plutôt qu'à une réparation de type HR qui nécessite plus de temps. Nous avons donc choisi d'étudier l'impact de tau sur la protéine 53BP1. Dans la littérature, il est connu que certaines protéines de réparation de l'ADN comme 53BP1 sont prises en charge par la dynéine et trafiquent le long des microtubules jusqu'au noyau lors de l'induction de dommages à l'ADN. Ce mécanisme favorise la translocation nucléaire de ces protéines et la réparation de l'ADN. Étant donné que la protéine tau interagit avec la dynéine (Dixit *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2018), nous avons vérifié si tau pouvait améliorer le trafic intracellulaire de 53BP1 et favoriser sa translocation nucléaire. Nous avons donc traité les cellules MCF7 shCtrl et shTau par irradiation et réalisé un fractionnement biochimique cytosol/noyau afin d'évaluer la distribution de 53BP1 entre le compartiment nucléaire et cytosolique.



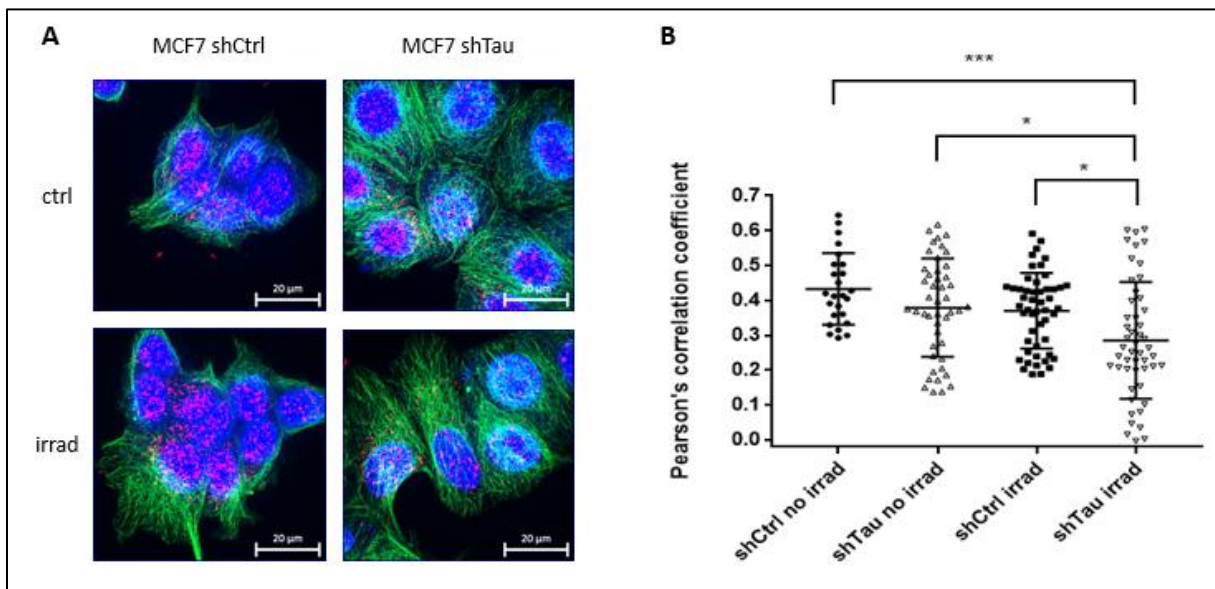
**Figure 5. Distribution cytosolique et nucléaire de 53BP1 après irradiation en présence ou non de tau.** (A)

Les cellules MCF7 shCtrl et shTau sont irradiées (2 Gy) puis un fractionnement biochimique permettant de récupérer les protéines cytosoliques et nucléaires et réalisé. Les fractions cytosolique et nucléaire des MCF7

shCtrl et shTau sont analysés par western blot grâce à un anticorps 53BP1. La pureté des fractions est évaluée par l'absence de l'histone H3 dans les fractions cytosoliques et l'absence de la protéine Hsp90 dans les fractions nucléaires. (B) La quantification de 53BP1 cytosolique est normalisée sur la quantité de protéine Hsp90 et de 53BP1 nucléaire sur la quantité de protéine H3. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SD du % de protéine cytosolique et nucléaire de 6 expériences indépendantes. Test statistique : ANOVA.

Les résultats obtenus montrent des premières différences en conditions contrôles (figure 5A). En effet, le ratio 53BP1 nucléaire/53BP1 cytosolique est égal à 2 dans les MCF7 shCtrl et équivalent à 1,4 dans MCF7 shTau (figure 5B). Lors d'une irradiation, alors que celui-ci augmente dans les shCtrl pour atteindre un ratio d'environ 3, il atteint une valeur d'environ 0,6 pour les shTau (figure 5B). Autrement dit, la translocation nucléaire de 53BP1 est augmentée dans les MCF7 shCtrl irradiées alors qu'elle est diminuée dans les MCF7 shTau.

La translocation nucléaire de 53BP1 met en jeu plusieurs mécanismes (Moudry *et al.*, 2012a; Poruchynsky *et al.*, 2015; von Morgen *et al.*, 2018). Afin de vérifier que celle-ci soit due à un trafic intracellulaire, nous avons réalisé une immunocytochimie des MCF7 shCtrl et shTau après irradiation. Nous avons réalisé un immunomarquage de 53BP1 (rouge) et de la tubuline (vert) afin de déterminer si une colocalisation est retrouvée.



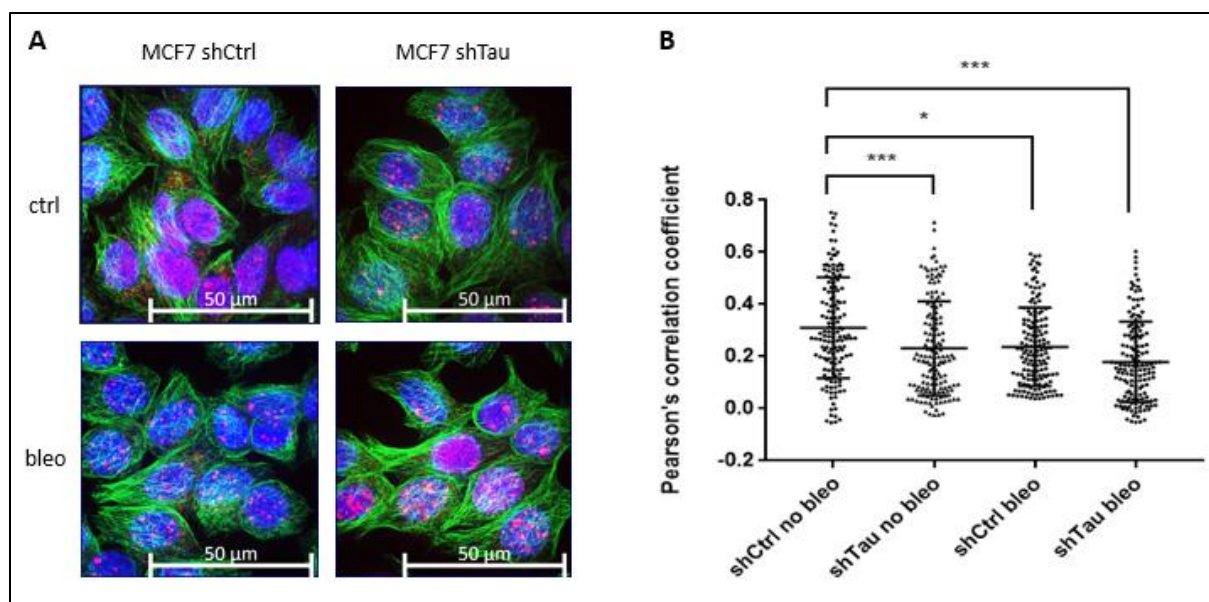
**Figure 6. Colocalisation entre 53BP1 et les microtubules après irradiation.** Les cellules MCF7 shCtrl et shTau ont été traitées aux rayons X (2 Gy) fixées et analysées par immunocytochimie (ICC). (A) Les acquisitions représentent 53BP1 en rouge (Alexa 568) et la tubuline en vert (Alexa 488). (B) L'évaluation de



l'indice de colocalisation est obtenue grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SD du % de cellules de 3 champs de 3 acquisitions différentes. Test statistique : Kruskal-Wallis.

Nous avons utilisé ici le coefficient de corrélation de Pearson qui permet de déterminer l'indice de colocalisation entre 53BP1 et la tubuline. En conditions basales, l'absence de tau est associée à une diminution non-significative de la colocalisation entre 53BP1 et la tubuline d'environ 1,1 fois. En revanche, en conditions de traitement, la colocalisation est 1,4 fois plus importante pour les MCF7 shCtrl que pour les MCF7 shTau. De manière intéressante, une diminution de 1,4 fois est également observée entre les MCF7 shTau contrôles et irradiés (figure 6). Ces résultats indiquent donc que 53BP1 est enrichi au niveau du microtubule dans les MCF7 shCtrl contrôles et irradiés et n'est plus retrouvé dans les MCF7 shTau irradiés.

Afin d'étendre ces résultats à un autre traitement, nous avons réalisé la même expérience avec un traitement à base de bléomycine. Les résultats obtenus dans la figure 7 montrent un profil similaire à celui obtenu pour irradiation.



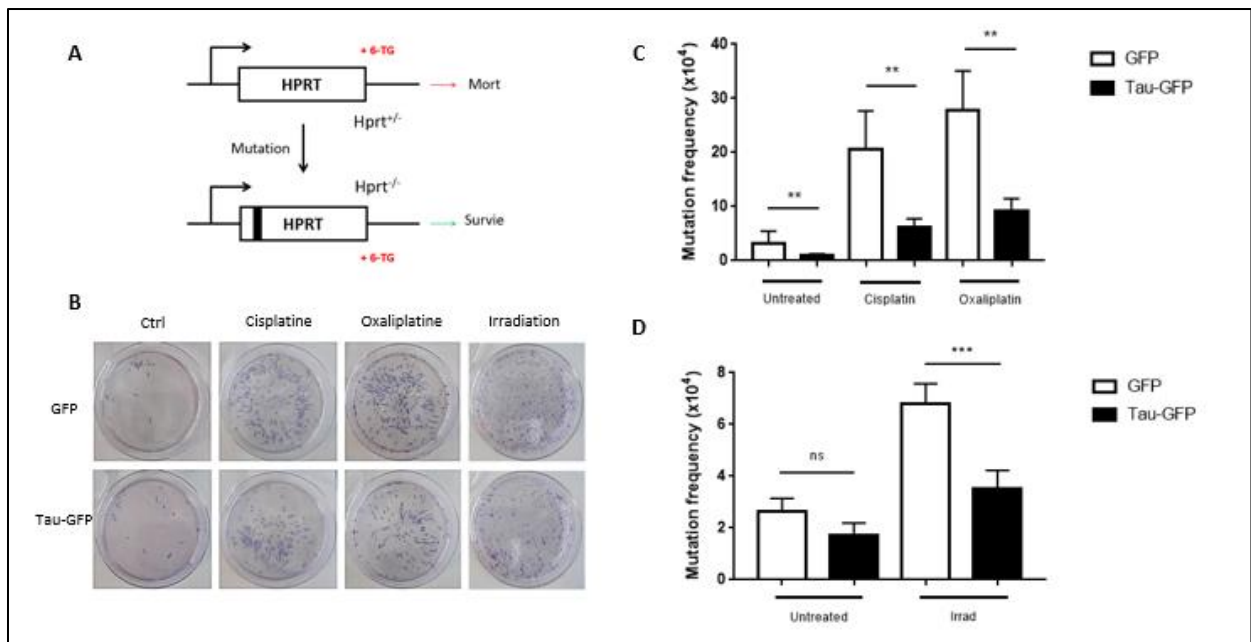
**Figure 7. Colocalisation entre 53BP1 et les microtubules après un traitement bléomycine.** Les cellules MCF7 shCtrl et shTau ont été traitées à la bléomycine (30  $\mu$ g/ $\mu$ l, 2h) fixées et analysées par immunocytochimie (ICC). (A) Les acquisitions représentent 53BP1 en rouge (Alexa 568) et la tubuline en vert (Alexa 488). (B) L'évaluation de l'indice de colocalisation est obtenue grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Les

résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SD de 3 champs de 3 acquisitions différentes. Test statistique :  
Kruskal-Wallis.

En conditions basales, nous observons une diminution de colocalisation significative dans les MCF7 shTau d'environ 1,4 fois en comparaison avec les MCF7 shCtrl. Le niveau basal de colocalisation entre 53BP1 et le microtubule est donc moins important pour les MCF7 shTau. Après le traitement à la bléomycine, la protéine 53BP1 dans les MCF7 shTau colocalise environ 1,3 fois moins que dans les MCF7 Ctrl. De manière intéressante, l'irradiation entraîne également une diminution de colocalisation d'environ 1,3 fois et 1,2 en comparaison avec les conditions contrôles pour les MCF7 shCtrl et MCF7 shTau, respectivement (figure 7B). Cette expérience montre une colocalisation plus faible entre 53BP1 et le microtubule en conditions contrôle et d'irradiation pour les MCF7 shTau. Ainsi, cette absence de recrutement de 53BP1 au microtubule peut expliquer sa séquestration cytosolique observée en absence de tau (figure 5).

#### e. La protéine tau apporte de la stabilité génomique

Les lésions générées par les traitements endommageant l'ADN, lorsqu'elles sont non réparées, sont responsables de l'efficacité de ces traitements. La réparation de l'ADN est un mécanisme permettant de rétablir une stabilité génomique et est donc responsable de leur inefficacité. Nos résultats précédents montrent que la protéine tau améliore l'activité de la NHEJ et de la HR. Sa présence dans une cellule devrait donc être associée à une fréquence de mutations plus faible générées par ces traitements. Nous avons donc réalisé un test Hprt permettant d'évaluer la fréquence de mutation (MF, *Mutation frequency*) en présence ou en absence de tau. Pour cela, nous avons utilisé les cellules CHO-K1 transfectées stablement avec la GFP ou la Tau-GFP. Les CHO-K1 possèdent un gène *Hprt*<sup>+/-</sup>. Le traitement de ces cellules avec des agents génotoxiques induisent le phénotype *Hprt*<sup>-/-</sup>. L'ajout de 6-TG permet de sélectionner les mutants *Hprt*<sup>-/-</sup> des cellules *Hprt*<sup>+/-</sup>. En effet, la 6-TG sera incorporée à l'ADN par l'expression du gène *Hprt*<sup>+/-</sup> et entraînera une mort cellulaire (figure 8A) (Silva *et al.*, 2005). La MF a alors été évaluée pour des traitements à base de cisplatine (10  $\mu$ M, 2h), d'oxaliplatine (20  $\mu$ M, 2h) et de rayons X (4 Gy) et comparée entre les CHO-K1 GFP et Tau-GFP.



**Figure 8. Effet de tau sur la stabilité génomique.** (A) Les cellules CHO-K1 qui possède le gène  $Hprt^{+/-}$  sont transfectées stablement par un vecteur codant la GFP ou Tau-GFP et ont été traitées au PBS (untreated), cisplatine (10  $\mu$ M, 2h), oxaliplatine (20  $\mu$ M, 2h) ou par rayons X (irrad, 4 Gy). (B) Les photos les plus représentatives des colonies survivantes après sélection par la 6-TG sont représentées en et (C) la quantification de l'ensemble des colonies survivantes des 6 boîtes est représenté en pour les traitements PBS, cisplatine et oxaliplatine et (D) pour le traitement contrôle et de rayons X. Test statistique : t-test non paramétrique, Mann-Whitney.

Les résultats obtenus montrent qu'en conditions basales, cisplatine et oxaliplatine les MF augmentent respectivement de 3,5 ; 3,6 et 3,1 fois dans les CHO-K1 GFP en comparaison avec les CHO-K1 Tau-GFP (figure 8C). Pour le test sous irradiation, les résultats indiquent une augmentation de la MF d'environ 1,4 fois et 1,8 fois dans les MCF7 shTau en comparaison avec les MCF7 shCtrl pour les conditions basales et d'irradiation, respectivement (figure 8D). L'expression d'une tau dans les CHO-K1 est donc associée à une MF plus faible à la fois en conditions basales mais également lors de traitements à base de sels de platine ou de rayons X (figure 8). Ces résultats indiquent que la protéine tau prévient l'apparition de mutations en conditions basale et de traitements et est donc impliquée dans la stabilité génomique. Afin de vérifier si cette stabilité génomique est également obtenue dans nos cellules MCF7 shCtrl et shTau, nous avons réalisé un test de survie. Pour cela, nous avons irradié nos cellules à une intensité de 4 Gy, une dose suffisamment importante pour induire de la mort cellulaire. 200 000 cellules ont ensuite étéensemencées dans 5 boîtes de 100 mm. Les colonies survivantes ont été

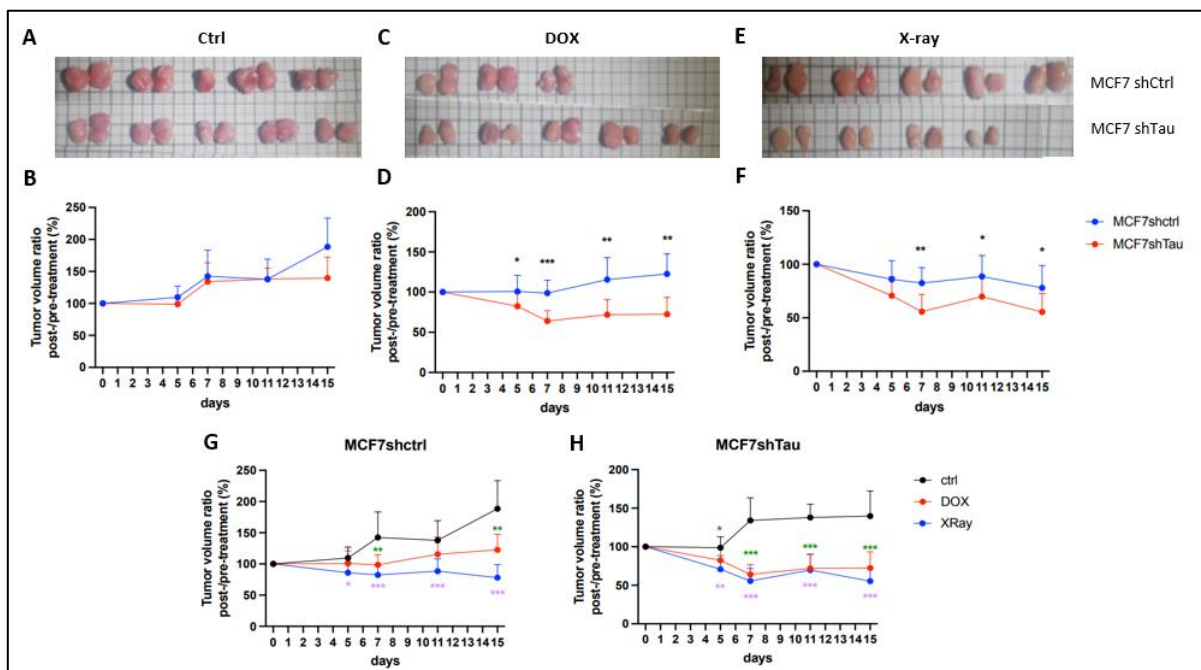
fixées et colorées au Giemsa (4%) au bout de 15 jours. Les résultats obtenus montrent qu'il y a en moyenne 3,1 fois moins de colonies après irradiation pour les MCF7 shTau que dans les MCF7 shCtrl. Les rayons X génèrent donc une chute de la survie cellulaire de 85,7% pour les MCF7 shCtrl et de 94,6% pour les MCF7 shTau (figure supplémentaire 3). Ces résultats corroborent ceux obtenus avec notre test Hprt qui met en évidence un effet en condition de traitement (figure 8).

#### f. Souris SCID, xénogreffes et volume tumoral

Les résultats obtenus précédemment montrent qu'en réponse à un endommagement de l'ADN par différents agents, la protéine tau améliore les voies NHEJ et la HR et apporte donc une stabilité génomique et une résistance face à ces traitements. Ces résultats ayant été obtenus *in cellulo*, nous avons voulu vérifier si cet effet est transposable *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de souris SCID avec des xénogreffes de nos cellules MCF7 shCtrl et shTau. Ces souris ont été traitées par chimiothérapie à base de doxorubicine hydrochloride ou par radiothérapie à base de rayons X. Les traitements ont été commencés à partir de tailles de tumeurs de 100 mm<sup>3</sup>. L'évolution du volume tumoral a été évaluée tous les 4 jours pendant 15 jours.

Aux jours 5, 7, 11 et 15 post-traitements, les tumeurs MCF7 shCtrl traitées à la doxorubicine perdent respectivement 9,1% ; 28,6% ; 14,8 et 34,2% de masse tumorale en comparaison avec les tumeurs MCF7 shCtrl non traitées (figure 9G). La perte de volume pour les MCF7 shCtrl irradiées est respectivement de 21% ; 42,8% ; 37% et 60,5%. Pour les MCF7 shTau, aux mêmes jours, la perte pour le traitement doxorubicine est respectivement de 20% ; 53,3% ; 46,4% et 47,2% et le traitement aux rayons X induit une perte de 33% ; 59,2% ; 46,5% et 59,2% par rapport aux shTau non traitées (figure 9H). Les résultats obtenus ici montrent que les deux types de traitements induisent une régression tumorale. La comparaison des tumeurs shCtrl et shTau montre que la croissance de ces deux clones en absence de traitement est similaire (figure 9A, B). Pour le traitement de doxorubicine, le volume tumoral se stabilise la première semaine après traitement puis gagne progressivement 20% de plus à l'issue des 15 jours (figure 9D). Inversement, au bout de 7 jours, les MCF7 shTau ont perdu en moyenne un tiers de leur volume qui reste ensuite stable les 8 jours suivants. Au total, les tumeurs MCF7 shTau ont un volume tumoral environ 1,6 fois inférieur aux tumeurs MCF7 shCtrl tout au long du suivi post-traitement (figure 9D). Ces résultats indiquent que les tumeurs MCF7 shTau sont beaucoup plus sensibles à ce traitement en comparaison avec les tumeurs MCF7 shCtrl. De la même manière, l'effet des rayons X est plus

toxique pour les cellules MCF7 tau-négatives. 7 jours après irradiation, les tumeurs MCF7 shCtrl perdent en moyenne 12,5% de leur volume contre plus d'un tiers pour les MCF7 shTau. Les volumes des deux clones tumoraux restent ensuite stables jusqu'à l'issue des 15 jours post-traitement. Au final, les tumeurs MCF7 shTau ont un volume tumoral 1,5 fois inférieur aux tumeurs MCF7 shCtrl après la séance de radiothérapie (figure 9F). Ces résultats indiquent donc que les tumeurs MCF7 shCtrl sont beaucoup moins sensibles aux rayons X que les tumeurs MCF7 shTau.



**Figure 9. Évolution tumorale après traitement pour les MCF7 shCtrl et shTau.** Les tumeurs MCF7 shCtrl et shTau sont mesurée tous les 4 jours en moyenne et traitées une fois un volume de 100 mm<sup>3</sup> atteint. Les tumeurs MCF7 shCtrl et shTau ont été photographiées (A) sans traitement, (C) après un traitement à base de doxorubicine ou (E) de rayons X. Les courbes d'évolution du volume tumoral sont représentées (B) pour les tumeurs non traitées, (D) pour les tumeurs traitées à la doxorubicine et (F) pour les tumeurs irradiées. Une représentation de l'effet des traitements de chimiothérapie et radiothérapie est illustrée (G) pour les MCF7 shCtrl et (H) shTau. Les courbes obtenues sont les résultats de 5 souris par groupe de traitement et par lignée.

En conclusion, les traitements à base de doxorubicine ralentissent modérément la progression des tumeurs MCF7 shCtrl alors qu'elle diminue de façon plus importante celle des tumeurs MCF7 shTau. Les tumeurs tau-positives sont donc plus résistantes aux chimiothérapies à base de DDA et à la radiothérapie.

#### 4. Discussion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une nouvelle fonction de la protéine tau dans l'activité de réparation NHEJ et HR. Cet effet de tau dans les cellules de cancers mammaires MCF7 et MDA-MB-231 se traduit par une réparation plus rapide des CDB induites par un traitement aux rayons X et à la bléomycine. Nous avons pu lier la fonction microtubulaire de tau avec un transport de la protéine 53BP1 le long des microtubules vers le centrosome favorisant ainsi sa translocation nucléaire. En réponse à des traitements endommageant l'ADN, les cellules tau-positives affichent en effet un enrichissement de 53BP1 dans le noyau alors qu'il est séquestré dans le cytosol des cellules tau-négatives (figure 10). L'amélioration des activités de réparation des CDB en présence de tau apporte une meilleure stabilité génomique. En effet, la réalisation d'un test de mutagenicité Hprt a permis de montrer que l'expression de tau est associée à une fréquence de mutations beaucoup plus faible. Ces résultats se traduisent *in vivo* par une résistance thérapeutique à une chimiothérapie à base de doxorubicine ainsi qu'à une radiothérapie à base de rayons X dans un modèle murin de xénogreffe.

Dans un premier temps, nous avons donc déterminé l'effet de traitements à base de bléomycine ou d'irradiation sur des cellules de lignées de cancers mammaires exprimant *MAPT*. Nous avons choisi la lignée MCF7 et la lignée MDA-MB-231 pour deux raisons : premièrement, elles expriment toutes deux *MAPT* à des degrés différents. L'expression de *MAPT* est plus importante dans les MCF7 que dans les MDA-MB-231 (Rouzier *et al.*, 2005; Spicakova *et al.*, 2010). Deuxièmement, les MCF7 ont un phénotype luminal A (surexpression du récepteurs ER et PR) alors que les MDA-MB-231 ont un phénotype triple-négatif (ER- ; PR- ; Her2-). Il était intéressant d'avoir cette lignée triple-négative puisqu'il s'agit du sous-type tumoral le plus agressif et présentant un nombre plus limité de traitements (Collignon *et al.*, 2016).

En réponse à une irradiation ou un traitement à la bléomycine, nos résultats de cinétiques montrent une persistance de CDB dans les cellules shTau en comparaison avec les shCtrl à la fois dans les MCF7 et dans les MDA-MB-231. Cependant, ces différences de réparation entre les clones sont moins importantes pour les MDA-MB-231 que pour les MCF7. Une explication possible est que les MDA-MB-231 sont une lignée plus agressive que les MCF7 et répondent donc probablement moins bien à un traitement endommageant l'ADN. De plus, la littérature fait état d'une expression de *MAPT* plus importante dans les MCF7 que dans les MDA-MB-231 (Rouzier *et al.*, 2005; Spicakova *et al.*, 2010).

Nos résultats de western blot montrent en effet que la quantité de protéine tau est environ 1,3 fois supérieure dans les MCF7 que dans les MDA-MB-231 (figure 1). La dépendance des MCF7 vis-à-vis de tau semble donc être plus importante que dans les MDA-MB-231. Ikeda et al ont notamment démontré que l'expression de *MAPT* dans la lignée œstrogène-dépendante MCF7, dépendait des œstrogènes (Ikeda *et al.*, 2010b). Ainsi, l'extinction partielle de tau dans ces deux lignées peut donc manifester des effets d'intensités variables.

Dans la littérature, la protéine tau est décrite comme pouvant fixer l'ADN au niveau de son petit sillon et lui apporter une protection physique face à différents agents, notamment au stress oxydant (Wei *et al.*, 2008b; Sultan *et al.*, 2011). Nos analyses de cinétiques de réparation de l'ADN après irradiation montrent que l'induction de CDB est identique entre les cellules MCF7 et MDA-MB-231 shCtrl et shTau. Si tau protégeait physiquement l'ADN dans ces cellules, nous aurions dû observer une différence de dommages immédiatement suite au traitement. De plus, nous n'avons pas trouvé d'augmentation d'interaction de tau avec l'ADN en réponse à des dommages. À l'inverse, nos cinétiques nous ont permis d'observer une diminution plus rapide des CDB au cours du temps dans les cellules shCtrl. De tels résultats nous ont mené à étudier l'impact de tau sur la réparation des CDB. Nous avons donc pu mettre en évidence que la protéine tau améliore les activités de réparation des CDB de type NHEJ et HR et permet donc une meilleure stabilité génomique.

Mao et al ont montré qu'une activité NHEJ était réalisée en une demie heure alors qu'une activité HR durait presque 7 heures (Mao *et al.*, 2008a). Nos résultats montrent que la protéine tau améliore à la fois l'activité NHEJ et l'activité HR de façon significative. Cependant, les cinétiques de réparation de l'ADN que nous avons réalisées montrent qu'à l'arrêt d'un traitement, une diminution plus rapide des CDB s'opère entre la première demie heure et les deux premières heures. Étant donné le temps relativement court dans lequel notre cinétique s'inscrit et un début de disparition des dommages à partir des deux premières heures post-traitement, les différences observées sont probablement dues à l'activité NHEJ améliorée par la protéine tau. Toutefois, nos résultats présentés dans la figure 4 indiquent que la protéine tau est également capable d'améliorer l'activité de réparation de type HR (figure 4C). Il nous aurait alors fallu une cinétique plus longue, avec une génération de CDB plus importante pour pouvoir observer les effets de cette HR améliorée dans nos immunocytochimies.

Afin d'en expliquer le mécanisme, nous nous sommes basées sur une étude montrant que certaines protéines de réparation de l'ADN pouvaient être transportées vers le centrosome par l'intermédiaire des

microtubules et favorisant ainsi leur translocation nucléaire (Poruchynsky *et al.*, 2015). En plus de son rôle dans la stabilité et la polymérisation des microtubules (Weingarten *et al.*, 1975), nous savons que la protéine tau affecte également le transport microtubulaire en interagissant notamment avec les protéines motiles des microtubules. Dans les neurones, il y est montré que tau favorise le transport rétrograde (Dixit *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2018). Étant donné que les observations faites dans nos cinétiques de réparation sont dues à une activité NHEJ améliorée, nous avons choisi d'étudier le transport nucléaire de la protéine 53BP1 en raison de son implication dans l'initiation de ce type de réparation (Bothmer *et al.*, 2010; Bunting *et al.*, 2010). Ainsi, nous avons pu montrer dans les MCF7 que l'extinction partielle de *MAPT* (MCF7 shTau) était associée à une rétention de la protéine 53BP1 dans le cytosol après irradiation. La protéine tau favorise donc la translocation nucléaire de 53BP1 en réponse aux dommages à l'ADN (figure 5). Nous avons en plus trouvé une colocalisation plus importante de 53BP1 avec la tubuline dans les cellules tau-positives que dans les cellules tau-négatives (figures 30 et 31). Le rôle de la dynamique microtubulaire et de la protéine 53BP1 dans la réparation des CDB avait déjà été mis en évidence par Lotterseberger et collègues par un mécanisme impliquant la mobilité des CDB (en anglais « *DSB mobility* ») dans le noyau (Lottersberger *et al.*, 2015). Dans des travaux récents, Ma et ses collaborateurs ont pu démontrer que l'induction de CDB par un traitement à la bléomycine ou à l'irradiation induit une augmentation de la polymérisation des microtubules en phase G1 favorisant la NHEJ (Ma *et al.*, 2021). Cette étude renforce nos résultats montrant l'effet de tau sur la dynamique microtubulaire et le transport de 53BP1 en réponse à la bléomycine et à l'irradiation. La protéine 53BP1 est d'autant plus importante puisqu'elle est l'un des facteurs initiateurs de la voie DDR. Sans cette translocation nucléaire de 53BP1, l'initiation de la réparation est très fortement altérée. En effet, l'étude de Poruchynsky montre que la séquestration de protéines de la voie DDR comme 53BP1 est associée à une accumulation de CDB (Poruchynsky *et al.*, 2015). De plus, des travaux ont mis en évidence dans des cellules de la lignée d'ostéosarcome U2OS, que des défauts de translocation de 53BP1 par knock-down de la protéine de transport nucléaire NUP153 était associé à une accumulation de  $\gamma$ H2AX et sensibilisait ces cellules à l'irradiation (Moudry *et al.*, 2012a). Avec une séquestration cytosolique de 53BP1, l'activité NHEJ, étant effective dès la première demi-heure après l'apparition d'un dommage (Mao *et al.*, 2008a) ne peut avoir lieu. Dans l'étude de Moudry, il a été montré que la protéine de pore nucléaire NUP153 était essentielle à l'importation de 53BP1 dans le noyau. Dans leur étude, l'extinction partielle de NUP153 entraîne une séquestration de 53BP1 dans le cytosol, entraîne une accumulation de CDB et sensibilise les cellules à l'irradiation (Moudry *et al.*, 2012b). Cette dernière



étude, en complément d'autres, montre que l'entrée de 53BP1 dépend de sa séquence NLS, de l'importine  $\beta$  du complexe de pore nucléaire NUP153 (Moudry *et al.*, 2012b; von Morgen *et al.*, 2018). De manière intéressante, il a été montré que des formes pathologiques de tau altérait la protéine Nup98 et donc les imports nucléaires (Eftekharzadeh *et al.*, 2018). Bien que nous associions la translocation améliorée de 53BP1 à un transport microtubulaire, il est possible que la protéine tau intervienne dans d'autres de ces mécanismes.

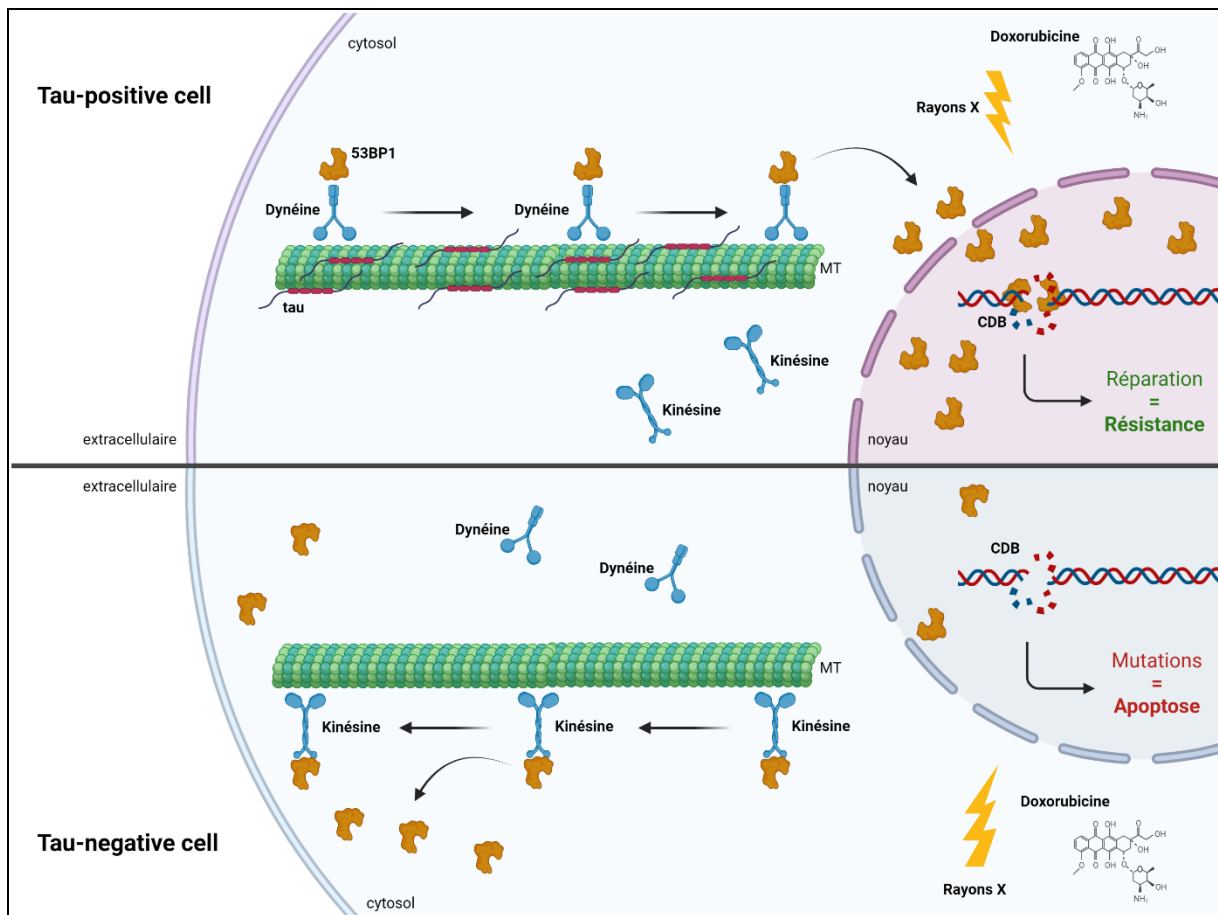
Certaines études cependant ont montré qu'il pouvait y avoir une dualité du rôle de 53BP1 dans les cancers. Par exemple, Chen et al ont étudié la perte de 53BP1 dans des cellules mutées pour *BRCA1* et ont montré que celles-ci gardaient une instabilité génomique importante et était plus sensibles aux traitements contenant des inhibiteurs de PARP (J. Chen *et al.*, 2020). De la même façon, une étude a mis en évidence que lors d'un traitement à base de rayonnements ionisants, la présence de 53BP1 était requise pour la survie de cellules de différentes lignées de cancer prostatique et pulmonaire en améliorant l'efficacité de réparation des CDB (Eke *et al.*, 2020). Cependant, dans des lignées cellulaires ou des tissus de cancer colorectal, Bi et al ont montré que la perte de 53BP1 était de mauvais pronostic pour les patients puisque les cellules cancéreuses n'ayant plus de point d'arrêt dans leur cycle en condition de dommages ce qui leur permet de continuer à croître. À l'inverse, l'expression de 53BP1 semble être bénéfique au patient puisqu'elle permet un arrêt du cycle et une apoptose en conditions de traitement. De manière intéressante, les auteurs de cette étude ont montré que cet effet n'était valable que chez les hommes et qu'aucune corrélation n'était retrouvée chez les femmes (Bi *et al.*, 2015). Ceci montre que cet effet de 53BP1 n'est pas généralisable à tous les contextes et peut dépendre du type de tumeur, du stade, grade, du genre ou encore du génome et protéome de la cellule cancéreuse.

En plus de 53BP1, la protéine p53, les protéines du complexe DNA-PK (Ku70, Ku80, DNA-PKcs), BRCA1/2, les protéines du complexe MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) ou encore RPA et Rad51 peuvent également être soumises à un trafic microtubulaire (Giannakakou, Sackett, *et al.*, 2000; Giannakakou *et al.*, 2002; Li and Martinez, 2011; Poruchynsky *et al.*, 2015). Il a d'ailleurs été montré que les protéines de réparation ATM, ATR, DNA-PKcs ou encore Chk1/2 étaient retrouvées au niveau des centrosomes et donc à proximité des pores nucléaires (Mullee and Morrison, 2016). Récemment, dans les neurones de différentes tauopathies telles que la MA, la maladie de Pick, la CBD ou encore la PSP, une séquestration cytosolique de la protéine BRCA1 a été retrouvée et liée à la mort neuronale (Kurihara *et al.*, 2019; Nakamura *et al.*, 2020). Ces études montrent donc que plusieurs protéines impliquées dans la

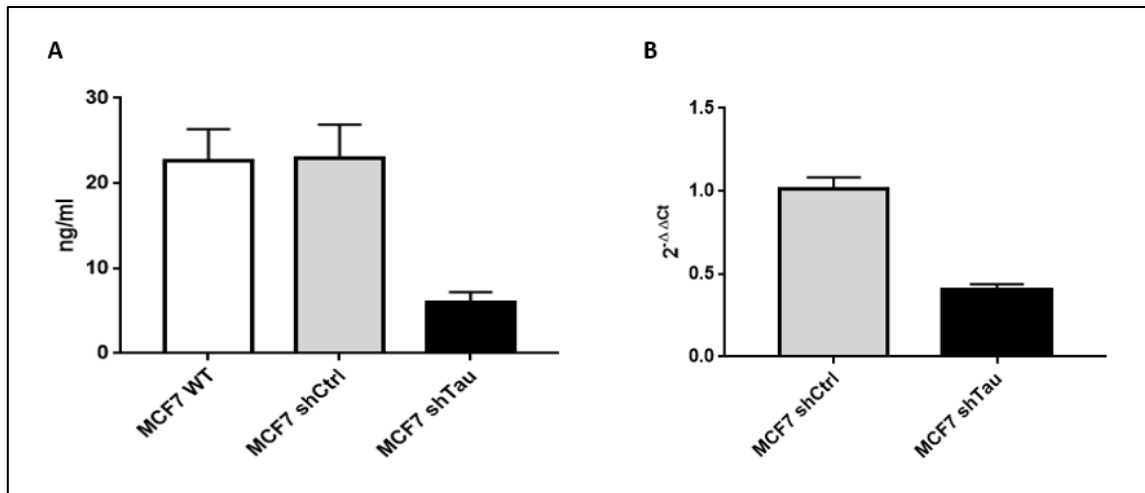
réparation de l'ADN peuvent être soumises à un trafic intracellulaire vers le centrosome et donc vers le noyau et que des défauts de translocation nucléaire sont observées dans les tauopathies. Bien que nous n'ayons étudié que la translocation de 53BP1, il est possible que tau, dans des cellules cancéreuses, participe au trafic intracellulaire d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.

Dans notre étude, les différents résultats que nous avons obtenus ne permettent pas de discriminer directement quelles isoformes de tau sont responsables de la résistance aux DDA que nous observons. Cependant, nos analyses ont été réalisées principalement dans les cellules de la lignée MCF7, MDA-MB-231 dont les six isoformes de tau sont représentées (Spicakova *et al.*, 2010) et de cellules HeLa transfectées avec un plasmide codant l'isoforme tau-1N4R. Nous pouvons alors conclure que cette dernière isoforme, majoritairement représentée chez l'Homme (Andreadis, 2005; Liu and Götz, 2013), participe à cette résistance thérapeutique. Aussi, notre test Hprt a été réalisé sur la lignée CHO-K1 transfectée stablement avec un plasmide codant Tau-GFP 1N4R. Nos résultats indiquent donc que l'effet de tau sur l'activité de réparation de l'ADN et la stabilité génomique est valable pour une protéine tau 1N4R. Nous avons trouvé que l'effet de tau sur les activités de réparation de l'ADN dépend d'un mécanisme impliquant les microtubules. L'affinité des isoformes 3R de tau pour les microtubules étant plus faible que celle des isoformes 4R (Goedert and Jakes, 1990), l'impact d'une protéine tau 1N3R ou 2N3R sur le transport microtubulaire de 53BP1 devrait donc être atténué.

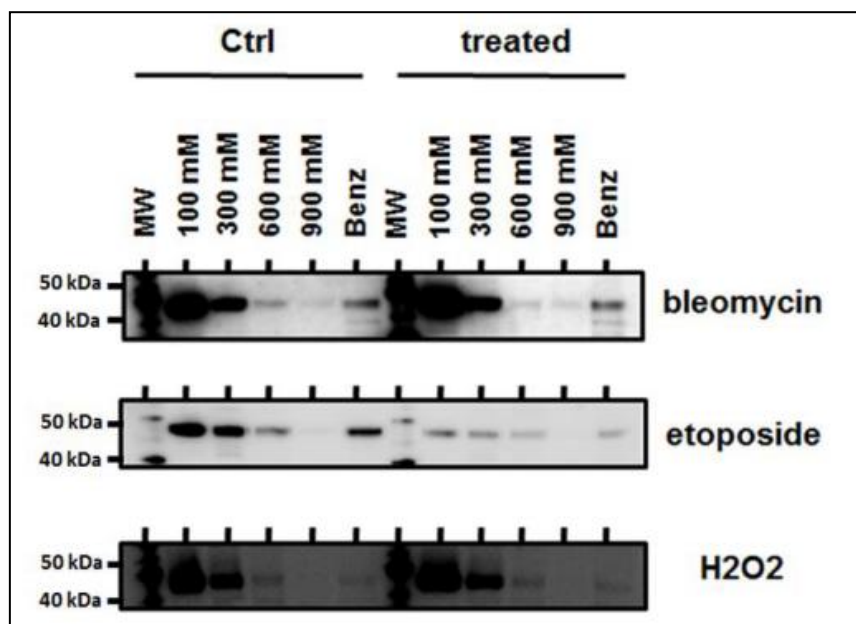
En plus de la résistance qu'elle apporte face aux taxanes, cette étude montre que la protéine tau est également un facteur de résistance face aux chimiothérapies à base de DDA et à la radiothérapie à base de rayons X. Ensemble, ces résultats montrent l'importance de cibler la protéine tau dans les tumeurs mammaires. Ces effets devront être étudiés dans d'autres types tumoraux afin de vérifier s'ils sont généralisables.



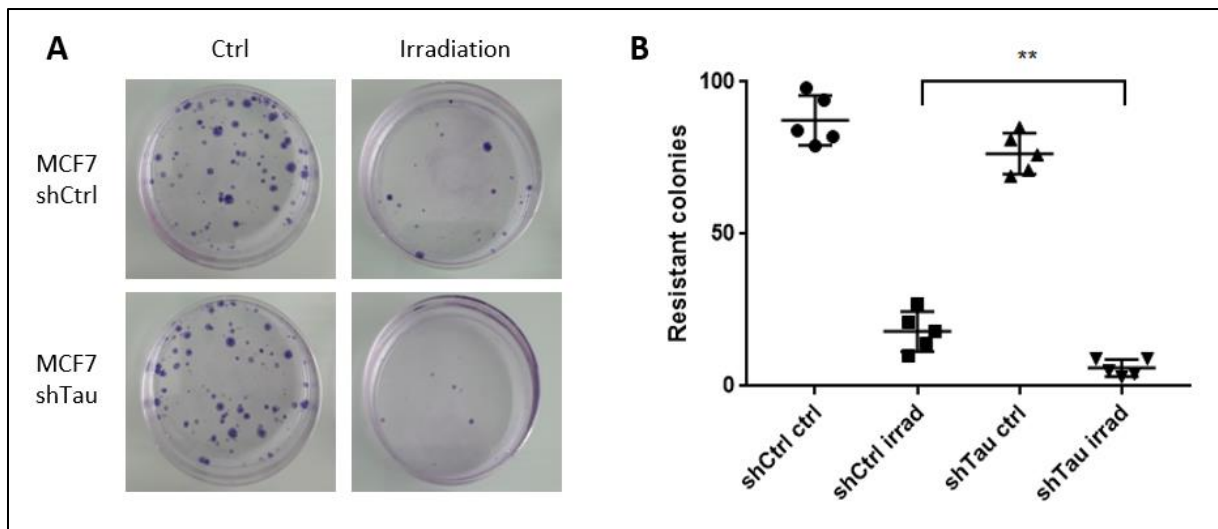
**Figure 10. Modèle de l'effet de tau sur le transport rétrograde de la protéine 53BP1 et implications dans la résistance thérapeutique.** Dans une étude, il a été montré que la protéine 53BP1 immunoprécipite avec la dynéine et est transporté le long du microtubule vers le centrosome, favorisant sa translocation nucléaire. Après induction de dommages à l'ADN, un enrichissement de 53BP1 est retrouvé dans le noyau et est aboli en présence d'un agent bloquant la dynamique des microtubules (Poruchynsky et al., 2015). La protéine tau est connue pour réguler la dynamique des microtubules. Elle favorise également le transport rétrograde par la dynéine et défavorise le transport antérograde par la kinésine (Dixit et al., 2008; Chaudhary et al., 2018). Les résultats de notre étude montrent qu'en réponse aux rayons X et à la bléomycine, la protéine 53BP1 colocalise plus fortement avec la tubuline en présence de tau. Un enrichissement de 53BP1 nucléaire est observé en présence de tau alors que la présence d'un shTau est associée à une séquestration cytosolique de 53BP1. Tau favorise donc la voie DDR en améliorant les activités de réparation des CDB et menant à une stabilité génomique. La conséquence de ces mécanismes est une résistance thérapeutique aux chimiothérapies à base de DDA et aux rayons X, comme le montre nos résultats in vitro et in vivo (Created with BioRender.com).



**Figure supplémentaire 1. ELISA et RT-qPCR sur MCF7.** La présence de protéines tau ou de son ARNm est testée (A) par ELISA dans les MCF7 wt, shCtrl et shTau et (B) dans les MCF7 shCtrl et shTau RT-qPCR. Les graphiques sont la moyenne de trois cultures cellulaires indépendantes.



**Figure supplémentaire 2. Détection de la protéine Tau dans les fractions solubles et insolubles du noyau en présence ou non de dommages à l'ADN.** Les cellules de la lignée SH-SY5Y tetON ont été traitées avec la bléomycine (30 µg/ml, 2h) ou l'étoposide (20 µM dans 0,04% de DMSO, 2h) ou du peroxyde d'hydrogène (5 mM, 2h) puis fractionnées biochimiquement par concentration croissante en NaCl. La présence de tau dans ces différentes fractions nucléaires a été testée par western blot grâce à un anticorps Tau Cter.



**Figure supplémentaire 3. Test de survie des cellules MCF7 shCtrl et shTau après un traitement aux rayons X.** Les MCF7 shCtrl et shTau sont irradiées (4 Gy) puis comptées. Un total de 200 000 cellules viables par conditions estensemencé dans 5 boîtes de 100 mm et cultivées pendant 15 jours. (A) Les colonies survivantes sont fixées à l'éthanol 70% et colorées au Giemsa (4%). (B) Le nombre de colonies survivantes est représentée dans le graphique.

**Étude 2** : effet de tau sur l'organisation de la chromatine et résistance à la trichostatine A (TSA)

### **Tau increases chromatin compaction**

Thomas Rico<sup>1</sup>, Melissa Gilles<sup>1</sup>, Alban Chauderlier<sup>1</sup>, Thomas Comptdaer<sup>1</sup>, Romain Magnez<sup>2</sup>, Maggy Chwastyniak<sup>3</sup>, Herve Drobecq<sup>4</sup>, Florence Pinet<sup>3</sup>, Xavier Thuru<sup>2</sup>, Luc Buee<sup>1</sup>, Marie-Christine Galas<sup>1</sup>, Bruno Lefebvre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR1172 Lille Neurosciences et Cognition, France, <sup>2</sup>INSERM UMR1277 Hétérogénéité, Plasticité et Résistance aux Thérapies Anticancéreuses (CANTHER), France, <sup>3</sup>INSERM U1167 Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, France, <sup>4</sup>INSERM U1019 Centre d'Infection et Immunité de Lille (CIIL), France.

#### Abstract:

An extensive body of literature suggested a possible role of the microtubule-associated protein Tau in chromatin functions and/or organization in neuronal, non-neuronal and cancer cells. How Tau functions in these processes remains elusive. Here we report that Tau expression in breast cancer cell lines causes resistance to the anti-cancer effects of histone deacetylase inhibitors, by preventing histone deacetylase inhibitor-inducible gene expression and remodeling of chromatin structure. We identify Tau as a protein recognizing and binding to core histone when H3 and H4 are devoid of any post-translational modifications or acetylated H4 that increases the Tau's affinity. Consistent with chromatin structure alterations in neurons found in frontotemporal lobar degeneration, Tau mutations did not prevent histone deacetylase-inhibitor-induced higher chromatin structure remodeling by suppressing Tau binding to histones. In addition, we demonstrate that the interaction between Tau and histones prevents further histone H3 post-translational modifications induced by histone deacetylase-inhibitor treatment by maintaining a more compact chromatin structure.

Altogether, these results highlight a new cellular role for Tau as a chromatin reader, which opens new therapeutic avenues to exploit Tau biology in neuronal and cancer cells.

## 1. Introduction

Tau was first described as a neuronal microtubule-associated protein (MAP), regulating microtubule assembly and axonal transport. In the brain, the Microtubule Associated protein Tau (MAPT) constitutes a family of six isoforms containing three or four microtubule binding domains (named 3R and 4R respectively). The 4R isoforms have a higher affinity for microtubules (Wang and Mandelkow, 2016). In mouse, Tau3R(s) are expressed mostly during development whereas Tau4R becomes the predominant isoform in adult brain. It is thought that the lower affinity of Tau3R for microtubules allows the morphological changes necessary for neuronal differentiation and migration (Lu and Kosik, 2001; Avila et al., 2004; Sergeant et al., 2005). The affinity of Tau for microtubules is also tightly regulated by post-translational modifications. In tauopathies, there is abnormal Tau phosphorylation, leading it to detach from microtubules and favoring aggregation. In addition, several mutations in the MAPT gene have been identified in the inherited frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-MAPT). Known mutations either reduce Tau affinity for microtubules or change the ratio (3R/4R) (Goedert and Spillantini, 2000).

Since its original discovery as a brain disease gene, Tau expression has been detected in several non-neuronal cells like kidney, liver and muscle. Furthermore, Tau is overexpressed in different human breast, gastric, prostate cancer cell lines and tissues (Gargini et al., 2019). Previous studies have suggested that Tau expression could be a predictive marker for paclitaxel resistance in different cancer types (Wagner et al., 2005; Lei et al., 2020). At the molecular level, it has been demonstrated that Tau protects microtubule from paclitaxel binding by binding to Tubulin (Smoter et al., 2011).

However, recent studies show that the role of Tau is not limited to microtubule dynamics. It has been demonstrated that Tau interferes with several biological processes such as signaling pathways, synaptic functions, RNA metabolism, and DNA integrity and it even contributes to the inflammatory response (Bou Samra et al., 2017; Lebouvier et al., 2017; Sotiropoulos et al., 2017). Most intriguingly, chromatin abnormalities were detected in neurons from several tauopathy models, as well as in human pathological brains. Indeed, there are large-scale changes in histone acetylation, throughout the epigenome in Tau pathologies (Klein et al., 2019). Supporting the likely importance of Tau's effect on chromatin, overexpression of a FTDP-MAPT mutant in drosophila led to global chromatin relaxation, showed by the loss of H3K9me2 and altered distribution of heterochromatin-associated protein HP1 $\alpha$  (Frost et al.,

2014). In addition, peripheral cells from patients carrying Tau mutations also displayed chromosome numerical and structural aberrations as well as chromatin anomalies (Rossi et al., 2018). Frost et al. further demonstrated that this heterochromatin relaxation, thought to be a consequence of DNA damage induced by oxidative stress, allowed the expression of genes normally repressed in heterochromatin. Although the heterochromatin maintenance has been attributed to nuclear Tau in this context, the molecular mechanisms remain elusive (Mansuroglu et al., 2016). In the past decades, several histone deacetylase-inhibitors have been developed (Li and Seto, 2016).

At the molecular level, these compounds lead to accumulation of acetylated histones and non-histone proteins such as transcription factors, tubulin and heat-shock proteins, selectively altering gene expression (Glaser et al., 2003; Mitsiades et al., 2004). Global changes in chromatin supra-organization due to histone deacetylase-inhibitors can be also observed using different techniques such confocal laser scanning microscopy or enhanced sensitivity of DNA to nucleases (Toth et al., 2004 ; Gorisch et al., 2005;Marchion et al., 2005;Bustos et al., 2017). In addition, previous studies show that upon inhibition of acetylation, heterochromatin binding proteins reversibly detach and disperse within the nucleus (Taddei et al., 2001; Robbins et al., 2005; Cowell et al., 2011). The loss of binding of HP1s to heterochromatin is also thought to be important in the histone deacetylase-inhibitor mechanism of action as it induces also abnormal mitosis (Morgan and Shilatifard, 2015). To dissect the role of Tau in controlling chromatin functions and/or organization, we sought to perturb chromatin structure by inhibiting histone deacetylation with the pan-histone deacetylase-inhibitor trichostatin A (TSA). Here we described Tau as a new histone binding protein that stabilized condensed chromatin under histone deacetylase-inhibitor treatment, in part by preventing post-translational modification of histones. Taken together, our results shed new light on the role of Tau on chromatin organization in neuronal and non-neuronal cells.

## 2. Material & methods

### a. Materials and plasmids

pGEX vectors encoding Tau and Tau-deletion mutants and pGEX-CBP (aa 1202-1848) fused to GST tag were a kind gift from J.C. Lambert (INSERM U1167, Lille, France) and C. Smet-Nocca (UMR8576, Villeneuve d'Ascq, France) respectively. GFP-HP1beta was a gift from Tom Misteli (Addgene plasmid



# 17651). pGL4.31[luc2P/GAL4 UAS/Hygro] was purchased from Promega. Short hairpin Tau and RNA Ctrl vectors were purchased from Santacruz. pcDNA3-Tau4R has been described elsewhere (Lippens et al., 2004; Chauderlier et al., 2018). GAL4-Tau4R was obtained by inserting an in-frame Tau1N4R (referred to as Tau4R) cDNA isoform into the pM GAL4 DNA-BD cloning vector (Clontech). Purified histones and recombinant histones were obtained from Epiccypher and New England Biolabs respectively. Trichostatin A and BIX 01294 (Sigma) were reconstituted in dimethylsulfoxide and Tetracycline (Sigma) in ethanol.

#### b. Cell culture and transfection

SH-SY5Y human neuroblastoma cells expressing Tau4R tagged with the streptavidin-binding peptide (SBP) (referred as SH-SY5Y-(SBP)Tau4R) (Chauderlier et al., 2018), SH-SY5Y-Tet-on-Tau4R, HeLa cells, MCF7 and MDA-MB-231 were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine and 50U/ml penicillin/streptomycin (Gibco) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidified air. Transient and stable transfections experiments were performed using the lipofectamine 3000 reagent (Invitrogen). Transient luciferase assays were performed with the dual-luciferase assay system (Promega). For stable clones, luciferase activities were measured using the luciferase assay system (Promega) and normalized against protein concentration. To isolate stably transfected clones, HeLa cells were transfected with the pGL4.31[luc2P/GAL4 UAS/Hygro] (referred to as the GAL4UAS stable HeLa cell line) and selected with hygromycin (200 µg/ml). Of 6 clones tested for reporter activity one clone was chosen for further studies. MCF7 and MDA-MB-231 cells were transfected with short hairpin Tau or RNA Ctrl vectors and selected with puromycin (1 mg/ml). Clones were isolated and tested for Tau expression.

#### c. *In vitro* chromatin assembly

*In vitro* chromatin was obtained using the chromatin assembly kit (Active Motif) according to the manufacturer's guidelines. Assembled chromatin was then incubated with purified GST or GST-Tau and subjected to limited micrococcal nuclease digestion.

#### d. Micrococcal nuclease assays

Nuclei, from SH-SY5Y-Tet-on-Tau4R, induced, or not, with 1  $\mu$ g/ml tetracycline, 24h before adding the indicated concentration of trichostatin A (24h), were resuspended in TM2 (10 mM Tris at pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and protease inhibitor mixture) then CaCl<sub>2</sub> was added to 1 mM and subjected to micrococcal nuclease digestion. The reaction was stopped with addition of 2 mM final EGTA and treated with RNase and then with Proteinase K. The purified DNA was electrophoresed through a 20 cm 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide. Band intensities were quantified using the ImageJ Gel Analysis program.

#### e. RNA preparation and real-time PCR

Total RNA was prepared using RNeasyMinikit (Qiagen). Reverse transcription (RT) was performed using random hexamers as recommended by the manufacturer (Applied Biosystems). cDNAs were analyzed by PCR amplification using the TaqMan PCR master mix (Applied Biosystems) and a mix of RPLO primers and probes. The different probes were purchased from Applied Biosystems (assay on demand kit). Reactions (40 cycles) and data analysis were carried out with an ABI Prism 7700 (PerkinElmer).

#### f. Chromatin immunoprecipitations

The ChIP protocol used was previously described (Lefebvre et al., 2006). Primers sequences for the pGL4.31[luc2P/GAL4 UAS/Hygro] promoter were: forward, 5'-TTCCGGAGTACTGTCCTCCG-3', and reverse, 5'-GGTAGAATGGCGCTGGGCCC-3'; for p21 promoter: distal forward 5'-TGCTTCCCAGGAACATGCTTG-3' and reverse 5'-CTGAAAACAGGCAGCCCAAGG-3'; proximal forward 5'-GCAGAGGAGAAAGAAGCCTG-3' and reverse 5'-GCAGAGGAGAAAGAAGCCTG-3'; p21 (transcription start site) TSS forward: 5'-GCAGAGGAGAAAGAAGCCTG-3' and reverse 5'-GCTCTCTCACCTCCTCTG3'; for GAPDH TSS: forward 5'-GGCTCCCACCTTTCTCATCC-3' and reverse 5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGG-3'. Antibodies used in the studies included the following: anti-acetylated H3 (Active motif, 39139) and

anti-Tau1 (Millipore, MAB3420). All ChIP analyses were performed in at least two independent experiments.

g. Peptide Binding Assay

100 ng of purified GST-Tau was incubated with 2  $\mu$ g of biotin-labeled synthetic peptides corresponding to the N-terminal tail of histone H4 (Epiccypher) in a buffer containing 50 mM Tris·HCl at pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT, and 0.25% Nonidet P-40 for 4 h at 4°C, followed by incubation with 20  $\mu$ l of M-280 streptavidin beads (Dyna). Peptide sequences were derived from human histone H4, amino acids 1-23 (SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRL). Beads were washed, and bound material was eluted with 2x sample buffer. Bound materials were resolved on SDS/PAGE and immunoblotted as described below.

h. Western blot analysis

Western-blot analysis was carried out using primary antibodies directed against histone H3 (Millipore, 07-690), H4 (Santacruz, sc10810), H2A (Santacruz, sc8648), H2B (Active Motif, 39125), Tau C-ter (Galas et al., 2006) as described previously (Chauderlier et al., 2018).

i. GST-pulldown assays

GST-pulldown experiments were performed as described previously using 1  $\mu$ g of GST or GST-Tau proteins and the equivalent amount of indicated proteins (Chauderlier et al., 2018).

j. Immunofluorescence

MCF7shctrl, MCF7shTau or transfected HeLa cells with Tau4R and GFP-HP1 $\square$  were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Permeabilization was carried out in 0.2% Triton X-100 in phosphate-buffered saline for 10 min at room temperature. After 1 h saturation in 2% bovine serum albumin, immunostaining was performed using Tau antibody (recognizing the C-terminal domain

of Tau). Tau staining was revealed with a goat anti-rabbit IgG antibody coupled to Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes). Nuclear staining was performed by adding 1/2000 DAPI in phosphate-buffered saline for 10 min. Slides were then analyzed with a Zeiss LSM710 confocal laser scanning microscope (60x magnification). Images were collected in the Z direction at 0.80 µm intervals and quantifications were realized using the Image J plug-in.

#### k. ELISA measurements

Cellular levels of Tau protein were measured in serial dilution of cell lysates with a home-made tau ELISA kit. MCF7 shCtrl and shTau cells were lysed in 100µL RIPA (150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8 and completed with protease inhibitors). Then, 96-well microtiter plates (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) were coated overnight at 4°C with 100ng/well of our home-made antibody 9H12 (recognizing the 162-175 central region of tau) in a carbonate buffer (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6). After 5 washes with PBS containing 0.05% Tween (PBS-T), saturation was performed using 200µL of PBS-T with 2% casein (PCT) for 1 hour at 37°C. After 5 washes with the PBS-T buffer, 50 µL of diluted cell lysates in PCT buffer were incubated for a further 1 hour at 37°C. The standard containing 1N4R recombinant tau were also incubated. Then, 50µL of the detection antibodies (home-made TauE13N (7F5)) diluted at 1/1000 in PCT buffer were incubated overnight at room temperature. After 5 washes with PBS-T, followed a 1/32000 diluted anti-mouse IgG1 secondary antibody incubation. 100µL of TMB solution (one pellet of tetramethyl benzidine (TMB) diluted in citrate/phosphate buffer supplemented by 1/5000 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was incubated. The reaction was stopped by addition of 50µL of sulfuric acid. Optical density was measured with a spectrophotometer (Multiskan Ascent, Thermo Labsystem) at 450 nm.

#### l. Cell cycle analysis, cell death and apoptosis

Cell cycle, Cell death and Apoptosis were analyzed with the Click-It Plus EdU Alexa Fluor 647 kit (Thermofisher), Zombie NIR dye (Zombie NIR Fixable Viability Kit - Biolegend) and Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II (Calbiochem) according to the manufacturer's guideline. Fluorescence was analyzed using a LSR FORTESSA X20 cytometer (Becton Dickinson).

### m. Statistical analysis

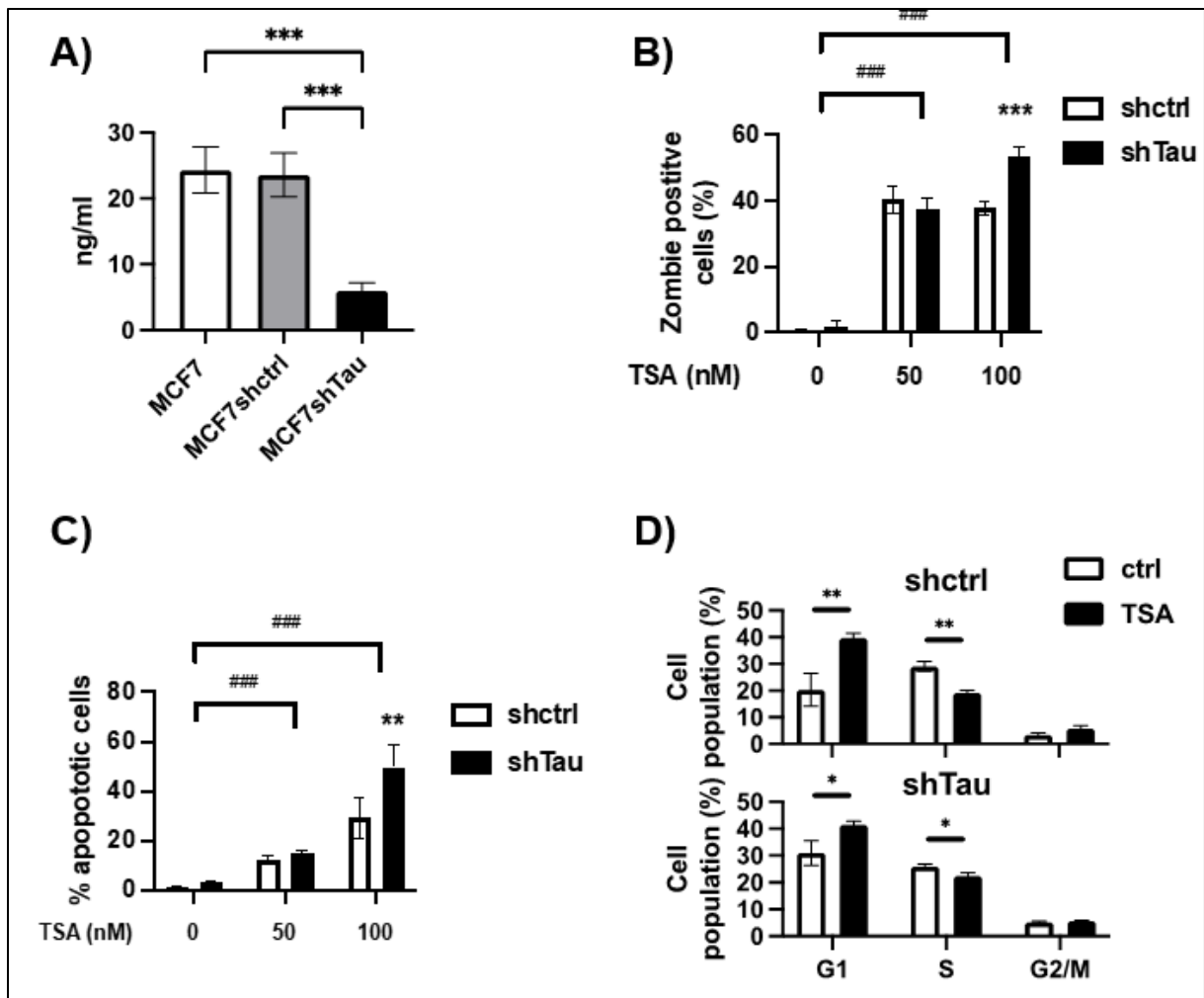
Data are mean  $\pm$  SD. Statistical tests were carried out using GraphPad Prism software (GraphPAD Inc.). Statistical significance between groups was analyzed with Wilcoxon-Mann-Whitney test and Mann-Whitney tests. A p value less than 0.05 was considered significant.

## 3. Results

### a. Tau knock-down increases breast cancer cell line sensitivity to TSA

In this study we sought to investigate the role of Tau in controlling chromatin structure and functions. For this we took advantage of breast cancer cell lines that are known to express Tau. Indeed, Tau expression has been extensively characterized in breast cancer cell lines and tumors (Rouzier et al., 2005; Matrone et al., 2010; Spicakova et al., 2010; Li et al., 2013). Because of the high stability of Tau proteins, we chose to overexpress either small hairpin RNA control (shctrl) or targeting Tau (shTau) in MCF7 and MDA-MB-231 cells. We characterized the efficiency of Tau mRNA knock-down in several clones compared to the parental shctrl cell lines. Tau protein level decreased 75% in the selected MCF7shTau clones (Figure 1A, supplementary Figure 1).

To dissect the role of Tau in controlling chromatin we sought to perturb chromatin structure by inhibiting histone deacetylation with TSA. First, we evaluated cell death, apoptosis and cell cycle progression by flow cytometric analyses in the two cell lines (as above we just illustrate our results with MCF7 cells in the main paper). We tested the effect of TSA (50 and 100 nM) in the presence or absence of short hairpin RNAs (Tau and Control). The percentage of dead cells were minimal in the absence of TSA (0.5% and 1.8% for MCF7shctrl and shTau respectively) (Figure 1B). After 48h TSA treatment (50 nM), we observed an increase in the number of dead cells for MCF7shctrl (40.3%) and MCF7shTau (37.4%). Increasing TSA concentration to 100 nM did not modify the proportion of dead cells for MCF7shctrl (37.7%). However, cell viability was further decreased in the absence of Tau. (53.4%). We observed a similar response for apoptosis (Figure 1C). At 50 nM TSA, we observed a similar percentage of apoptotic cells for shctrl (12.3%) and shTau cells (17.1%). The percentage of TSA-mediated apoptotic cells was higher at 100 nM for MCF7 shctrl cells (29.7%) and was further increased for MCF7shTau (48.2%).



**Figure 1. Tau inhibition increases MCF7 breast cancer cell line sensitivity to TSA.** (A) Tau protein expression in MCF7, MCF7shctrl and shTau were quantify by Elisa. (B) Effect of 100 nM TSA (48h) on cell death in the MCF7shctrl and MCF7shTau subclones. Cell death was determined by staining and flow cytometric analysis as described in the materials and methods. (C) Effect of 100 nM TSA (48h) on apoptosis in the MCF7shctrl and MCF7shTau subclones. Apoptosis was determined by flow cytometric analysis of the PI-positive and Annexin-V-positive cells as described in the materials and methods. (D) Cell cycle distribution was determined by FACS analysis of combined propidium iodide and EdU staining in MCF7shctrl and MCF7shTau in the absence or presence 100 nM TSA, 48h. Data are mean±SD \*\*P<0.01\*\*\*P<0.001. All results are representative of three independent experiments.

We next performed cell cycle analyses (Figure 1D). Indeed, treatment with HDACi can result in cell cycle arrest at the G1/S checkpoint (Newbold et al., 2016). The results revealed that TSA (100 nM) treatment led to an accumulation of MCF7shctrl cells in G1 (39.6 vs. 20.2%) with a concomitant decrease in the S-phase (19.2 vs. 29.1%). However, no significant difference was observed in

MCF7shTau cells after TSA treatment (41.4% for MCF7shTau vs. 39.6% for MCF7shctrl). This cell cycle analysis thus demonstrated that Tau expression did not impact on TSA-induced cell cycle arrest. Note that for all the above experiments we obtained similar results in MDA-MB-231 cells (supplementary Figure 2).

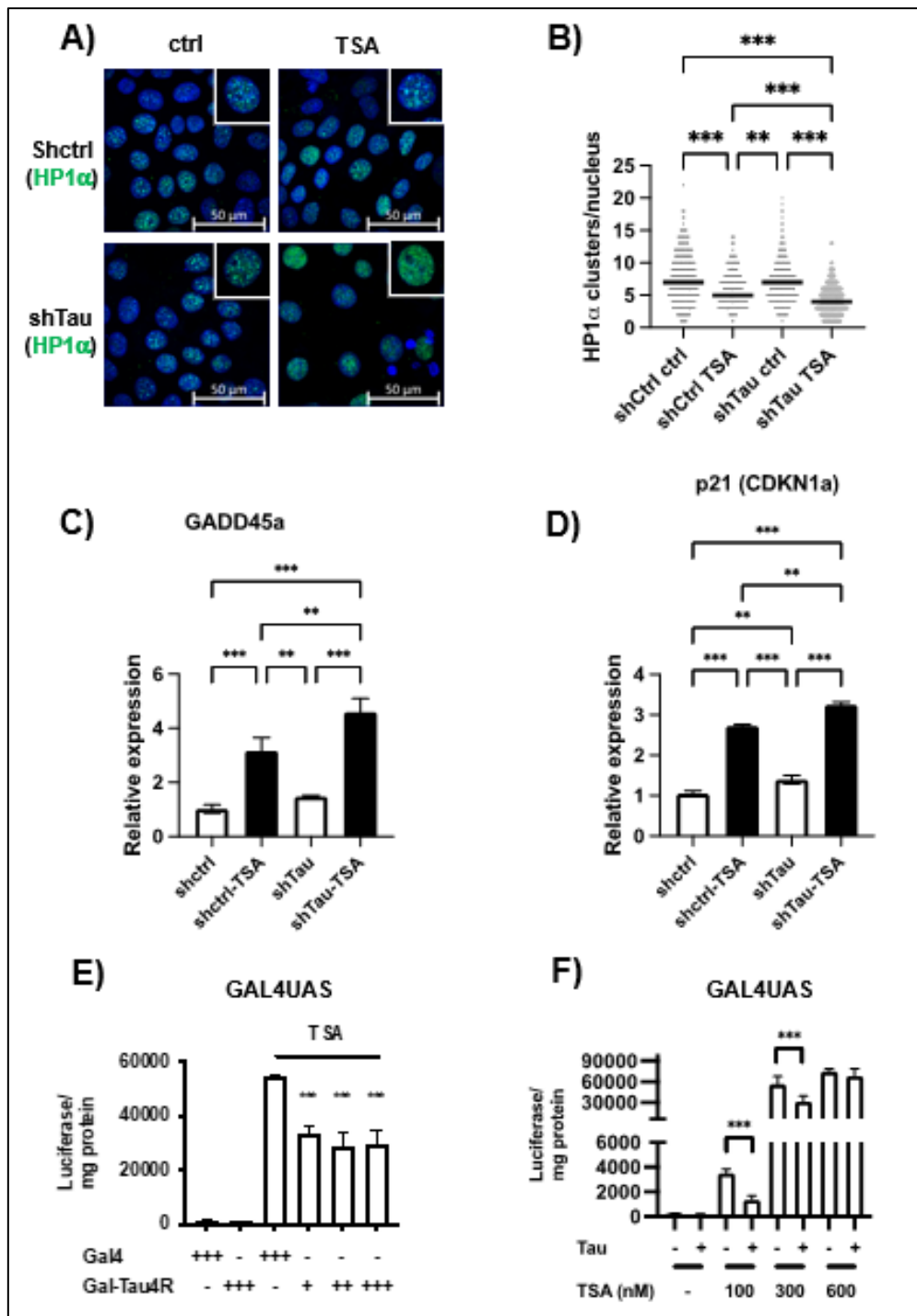
Collectively, these results indicated that Tau inhibition increase TSA sensitivity towards apoptosis and cell death in different breast cancer cell lines independently of cell cycle arrest.

#### b. Tau prevents TSA-dependent chromatin remodeling

The above results suggested that Tau modulates the cellular responses to histone deacetylase inhibitors. As histone TSA is known to induce the spreading heterochromatin-associated proteins, we next assessed the effect of TSA on the fate of the endogenous HP1 $\alpha$  in shTau-knockdown MCF7 cells (Taddei et al., 2001). Without TSA, MCF7 cells had around eight HP1 $\alpha$  clusters per nucleus in both sh-control and Tau-knockdown cells. TSA reduced this to five clusters and even further to just 3 HP1 $\alpha$  clusters per nucleus where Tau was knocked down (Figure 2A, B). Same results were found in other cellular models such as SH-SY5Y-Tet-on-Tau4R. In addition, western-blot analysis revealed that TSA treatment did not induce significant variations in HP1s and H3K9me1/2/3 levels between control and treated cells (supplementary figure 3). These data showed that Tau prevented PCH disruption induced by TSA in an independent manner of HP1s and H3K9me2/3 levels.

As well as disrupting pericentromeric heterochromatin, TSA affects histone acetylation at specific promoters and thereby influences chromatin structure and gene expression, of, for example, growth arrest DNA damage gene 45a (GADD45a) and p21 (cip/waf) (Richon et al., 2000; Hirose et al., 2003). As expected, these two genes were significantly upregulated by TSA in MCF7shctrl cells, as detected by RT-qPCR (3- and 2.5-fold induction respectively). Importantly this effect was exacerbated in cells with reduced Tau expression (4.6- and 3.2-fold induction respectively) (Figure 2 C and D). This indicates that Tau expression represses in part TSA-induced chromatin remodeling and gene expression.

To directly probe how Tau prevents TSA-induced chromatin remodeling and gene expression, we next used HeLa cells as they lack endogenous Tau. First, we generated a stable GAL4UAS (Upstream Activation Sequence)-responsive luciferase reporter HeLa clone that we subsequently selected for TSA-induced luciferase activity.



**Figure 2. Tau expression prevented TSA-dependent chromatin remodeling.** (A) Representative confocal sections of MCF7shctrl and shTau cells untreated or treated with 100 nM TSA for 24 h. DNA was revealed by DAPI and HP1 $\alpha$  was immuno-localized. (B) Quantification of HP1 $\alpha$  clusters per nuclei visualized as described previously and realized on three independent experiments. (C) GADD45a and (D) p21 (CDKN1a) expression in MCF7shctrl and shTau cells untreated or treated with 100 nM TSA for 24 h were analyzed by real-time PCR and normalized to RPLO. Results are expressed, relative to the basal activity set to 1, as the mean  $\pm$  SD of three independent assays. (E) Tau tethering prevents adjacent reporter gene activity induced by TSA. GAL4UAS responsive luciferase reporter Hela stable cell line was transfected with GAL4DBD (GAL4) or GAL4DBD-



Tau4R and then, 24h later, treated with TSA (600 nM) for 24h. The luciferase activity was determined as described in in the Materials and Methods. (F) Ectopic Tau4R expression prevents adjacent reporter gene activity induced by TSA. The GAL4UAS responsive luciferase reporter Hela stable cell line was transfected with a plasmid encoding Tau4R for 24h. Then, cells were treated with an increasing concentration of TSA, as indicated for 24h. The luciferase activity was determined as described in the Materials and Methods. Data are mean±SD \*\*P<0.01\*\*\*P<0.001 vs. control.

Indeed, Gal4 or other tethering systems have been previously used for example to study the effects of HP1 or the insulator CTCF on chromatin structure (Li et al., 2003; Ahanger et al., 2014). In our preliminary dose/response experiments, highest luciferase activity was observed at 600 nM TSA and we used this concentration in the following experiments. We next examined the resistance of Tau proteins to salt extraction. Indeed, salt solubility has been already used to monitor binding of proteins to the chromatin compartment (Lichota and Grasser, 2001). We found that only Tau4R isoforms but not Tau3R were tightly bound to chromatin and could potentially impact directly on chromatin structure/functions (supplementary Figure 4). We therefore targeted Tau4R to UAS responsive elements by fusing Tau4R to the heterologous DNA-binding domain GAL4 and transfected this plasmid into Hela stable clone. Importantly we found the luciferase activity was significantly reduced (50%) in the presence of GAL-Tau4R (Figure 2E). This demonstrates that the presence of Tau on the promoter reduced TSA-induced gene expression. We next wondered if this effect was due to the tethering of Tau4R to the promoter or whether this was independent of Tau4R fusion to GAL4. To this end, the wild-type Tau4R (i.e . without the GAL4 fusion) was transfected into a Hela clone and treated with various concentrations of TSA, up to 600 nM. Tau4R overexpression reduced the luciferase activity at 100 and 300 nM by around 50% decreased, whereas at 600 nM TSA there was no reduction (Figure 2F). The fact that the presence of Tau4R decreased the TSA-inducibility of the GAL4UAS responsive luciferase reporter gene suggests that Tau, in particular Tau4R isoforms, modulated the effects of histone acetylation on gene expression.

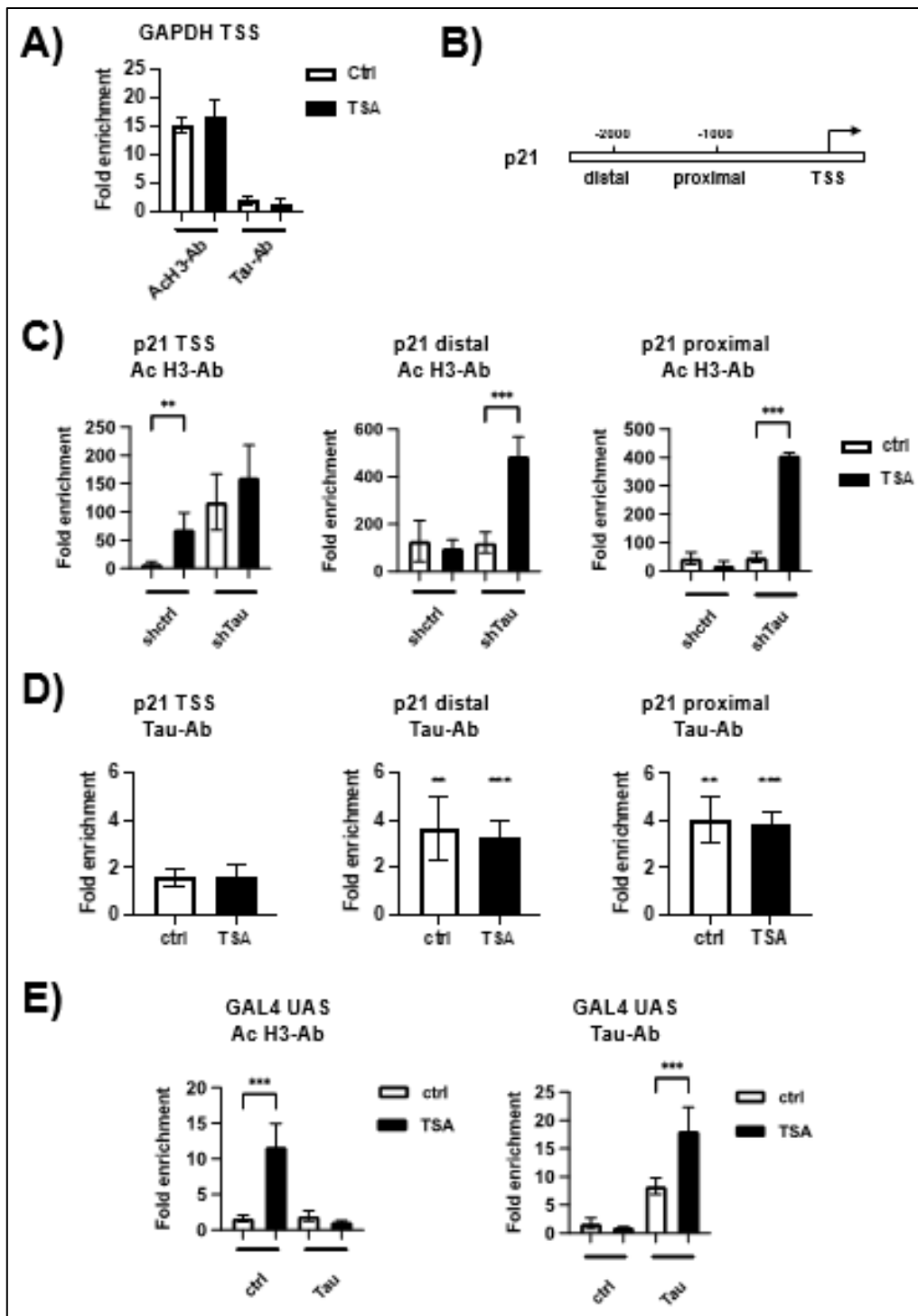
- c. Tau4R regulates histone deacetylase inhibitor induced genes through direct binding to chromatin

The above results suggest that Tau4R binds directly to chromatin to regulate gene expression. To test this hypothesis, we next performed chromatin immunoprecipitations assays. Antibodies specific for

acetylated H3 (ac-H3) and Tau were used to immunoprecipitate formaldehyde-cross-linked sonicated chromatin from MCF7 short hairpin Tau knockdowns and control cells treated, or not, with 100 nM TSA. Quantitative PCR analysis of input or immunoprecipitated DNA using acetylated H3 and Tau antibodies was carried out to detect different promoter regions. As a control of non-TSA-inducible gene, we first used primers encompassing the transcription start site of the GAPDH promoter. No change in the level of acetylated H3, nor Tau binding, were detected after TSA treatment (Figure 3A). We next examined the extent of acetylated H3 and Tau occupancy within the p21 promoter associated chromatin, for which activity upon TSA treatment and Tau depletion have been characterized previously (see Figure 2D, Figure 3B). As shown in Figure 3C, TSA induced a strong acetylation in shctrl cells (70- vs. 7-fold enrichment compared to IgG) while a high level of acetylated H3 was detected in shTau cells, irrespective of TSA treatment ( $\approx 160$ -fold enrichment). Moreover, Tau was barely detectable at the p21 transcription start site region in MCF7shctrl cells, expressing Tau proteins (less than 1.4-fold enrichment compared to IgG ctrl) (Figure 3D). qPCR analyses were then performed to detect the p21 proximal and distal regions. A significant increase in acetylated H3 was observed in MCF7shTau cells ( $\approx 10$ -fold enrichment compared to non-treated cells) but not in MCF7shctrl cells (Figure 3C). In addition, Tau was detected at the level of these regions in MCF7shctrl cells ( $\approx 4$ -fold enrichment) in absence or presence of TSA treatment (Figure 3D). These results are consistent with our hypothesis that Tau4R modulated the TSA induced- histone acetylation by binding to chromatin.

We next performed chromatin immunoprecipitations in the GAL4UAS responsive luciferase reporter HeLa stable cell line for which we observed similar gene response after exogenous Tau4R expression and 100 nM TSA treatment (see Figure 2F above). We performed qPCR as described previously to detect a fragment of the integrated promoter, encompassing the GAL4UAS responsive elements and the transcription start site. 100 nM TSA caused a ten-fold increase of ac-H3 in the control HeLa cells that was abrogated in the presence of transfected Tau4R. As expected, Tau4R was specifically enriched in the non-treated and TSA-treated conditions (7-fold and 16-fold respectively).

Taken together, these data demonstrated that Tau bound various DNA regions and inhibited histone H3 TSA-induced acetylation.

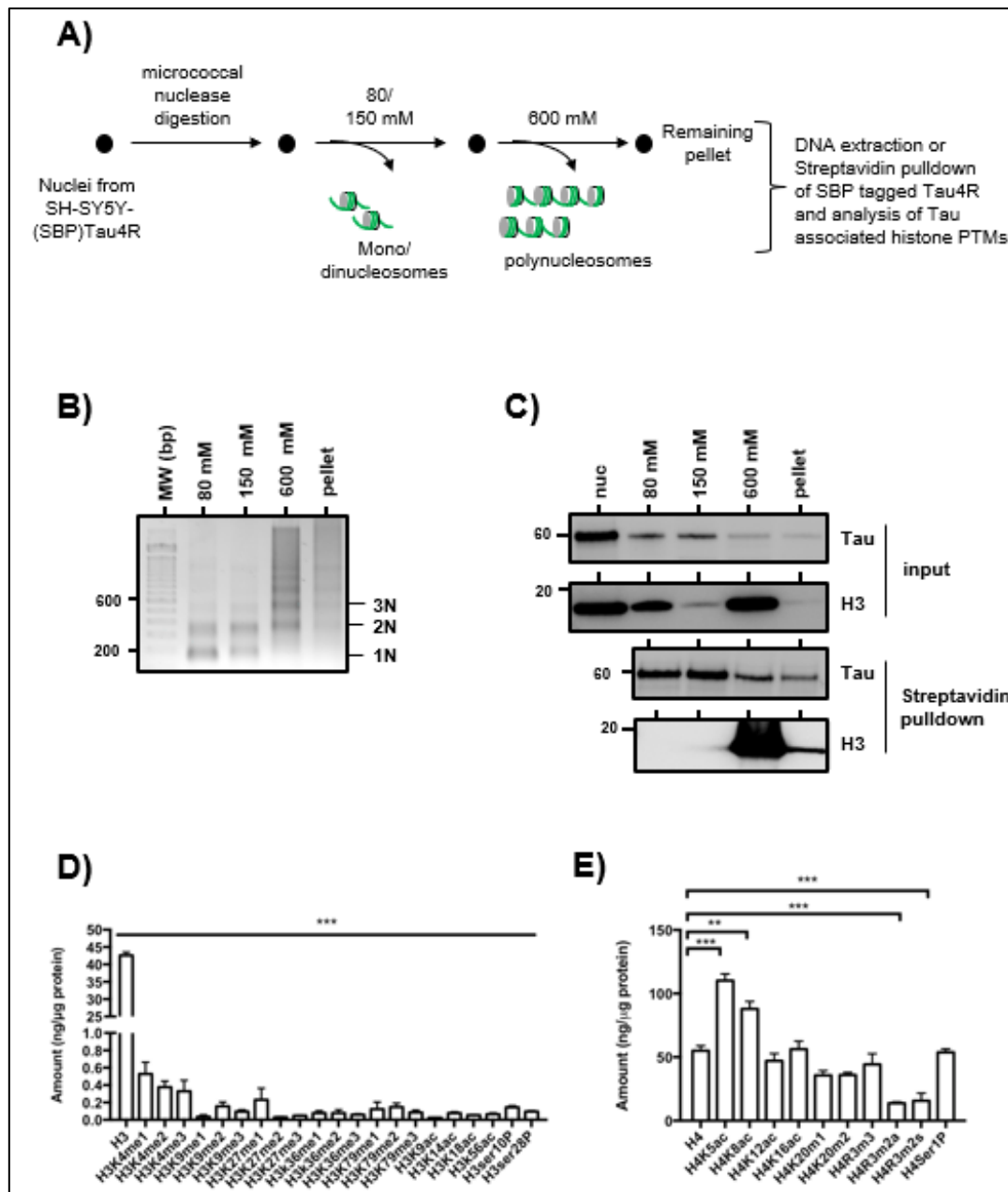


**Figure 3. Histone H3 acetylation and Tau occupancy at different promoters.** (A) Chromatin immunoprecipitations-qPCR analysis of H3 acetylation and Tau occupancy on the GAPDH promoter in MCF7shctrl cells in the indicated conditions. MCF7shctrl cells were subjected to cross-linking by 1% formaldehyde. Chromatin fragments were then immunoprecipitated using antibodies (Ab) against acetylated H3 (ac-H3) or Tau and analysed by quantitative PCR for the presence of the GAPDH promoter. (B) Functional organization of the p21 promoter. (C) ChIP-qPCR analysis of H3 acetylation in MCF7shctrl or shTau cells or (D) Tau occupancy in MCF7shctrl cells on the p21 promoter. (E) ChIP-qPCR analysis of H3 acetylation or Tau

occupancy on the stably transfected GAL4UAS responsive luciferase reporter transfected, or not, with Tau4R, then 24h later treated with 100 nM TSA for 24h. Cells were then subjected to cross-linking by 1% formaldehyde. Chromatin fragments were then immunoprecipitated using antibodies (Ab) against acetylated H3 or Tau and analysed by quantitative PCR for the presence of the GAL4 UAS promoter. Quantification of enrichment is represented as fold-enrichment relative to IgG. Data are mean $\pm$ SD \*\*P<0.01\*\*\*P<0.001.

#### d. Tau4R associates with condensed chromatin

Successive salt extraction of intact MNase-treated nuclei results in the isolation of chromatin fractions with different genome-wide profiles. (Henikoff et al., 2009). The low salt soluble fraction contains active chromatin while the high-salt fraction is enriched in condensed/active chromatin. In addition, transcribed regions of the genome are found in the remaining pellet. We therefore sought insights into Tau4R's distribution on chromatin. To do this we digested and fractionated stable SH-SY5Y cells overexpressing Tau4R fused in frame with the streptavidin binding peptide (SH-SY5Y-(SBP)Tau4R), allowing the elution of Tau4R-associated proteins (Figure 4A). As expected, DNA analyses showed that low salt fractions (80 and 150 mM) were mostly enriched in mononucleosomes, representing the active chromatin, while the high-salt fraction (600 mM) contained exclusively polynucleosomes, i.e. condensed chromatin (Figure 4B). In addition, western-blot analysis demonstrated that Tau was detected in all the fractions tested, was histone H3 (Figure 4C, input). We next wondered if Tau4R might be specifically interacting with nucleosomes in the different chromatin states. For this, we performed streptavidin pulldown of the Tau fusion and tested the presence for Tau itself and that of nucleosomes (by the presence of H3) by western-blot analysis. As shown in Figure 4C, immunoprecipitated H3 was almost exclusively in the high-salt fraction while Tau was more evenly present in all fractions. These results suggested that Tau was preferentially associated with condensed chromatin. Several hypotheses could explain this. Previous reports demonstrated that Tau can bind DNA *in vitro* and could be associated with GAGA responsive elements (GAGA-RE) (Benhelli-Mokrani et al., 2018). However, we found no preferential binding for GAGA-RE compared to control sequence using microscale thermophoresis (supplementary Table 1).



**Figure 4. Tau4R is associated with condensed chromatin.** (A) Schematic representation of salt fractionation of nucleosomes steps. Nuclei were isolated and digested with micrococcal nuclease and extracted successively with the indicated NaCl concentration. (B) DNA characterization from SH-SY5Y-(SBP) Tau4R cell chromatin fractions. DNA ladder obtained from micrococcal nuclease-treated nuclei purified as described in A). Nucleosomes are indicated on the right. (C) Tau interacts with histones in the condensed chromatin and the transcriptionally active fractions. Equal aliquots of each salt fraction were resolved on 12% SDS-PAGE and visualized by immunoblot analysis with antibodies against Tau or H3 (input). The remainder was used for streptavidin pull-down of SBP (streptavidin binding peptide) tagged Tau4R. Bound fractions were resolved on 12% SDS-PAGE and visualized by immunoblot analysis with antibody against H3. (D) Analysis of the different histone H3 or (E) H4 post-translational modifications associated with Tau in the condensed chromatin fraction (600 mM). Eluted Tau4R complex obtained from the 600 mM fraction obtained as described in (A) were

analyzed for H3 and H4 post-translational modifications using ELISA kits. Data are mean±SD \*\*P<0.01  
\*\*\*P<0.001. All results are representative of three independent experiments.

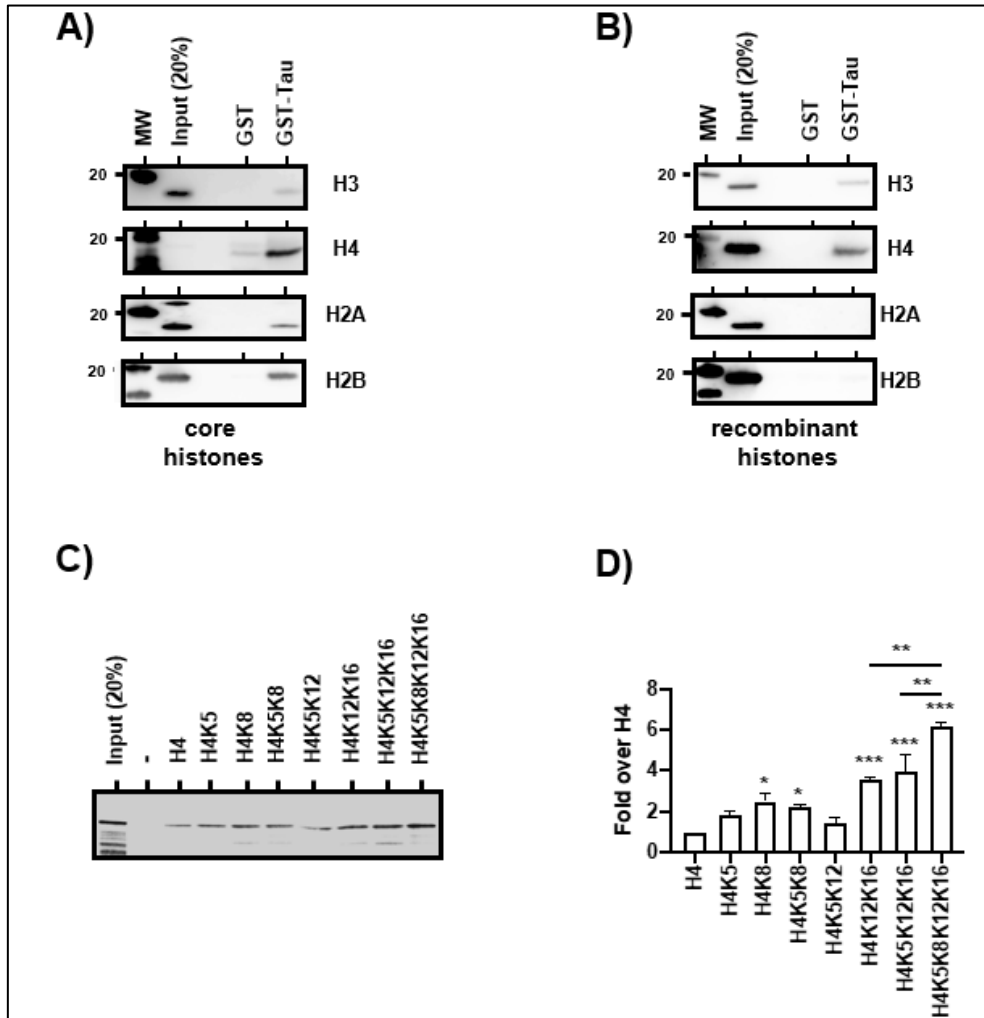
We therefore next considered the possibility that Tau could be associated with condensed chromatin because of post-translational modifications of histones, highly specific to the different chromatin compartments. After streptavidin pulldown of SBP-Tau4R, bound materials were eluted with biotin and tested for the presence of post-translational modifications of H3 and H4 with commercial ELISA kits. Non-modified H3 was present but none of the tested post-translational modifications were detected (Figure 4D). For H4 there was almost no signal for H4R3me3a and m2s. However, all the other tested modifications were strikingly present in the Tau immunoprecipitate (Figure 4E). Note that unmodified H4 signal was weaker than certain H4 post-translational modifications, suggesting that they might interfere with total H4-ab binding. However, normalization against total H3 did not modify the obtained results.

Taken together, these data place Tau4R in condensed chromatin regions containing acetylated H4 and unmodified H3.

e. Tau4R/chromatin interaction is mediated through histones

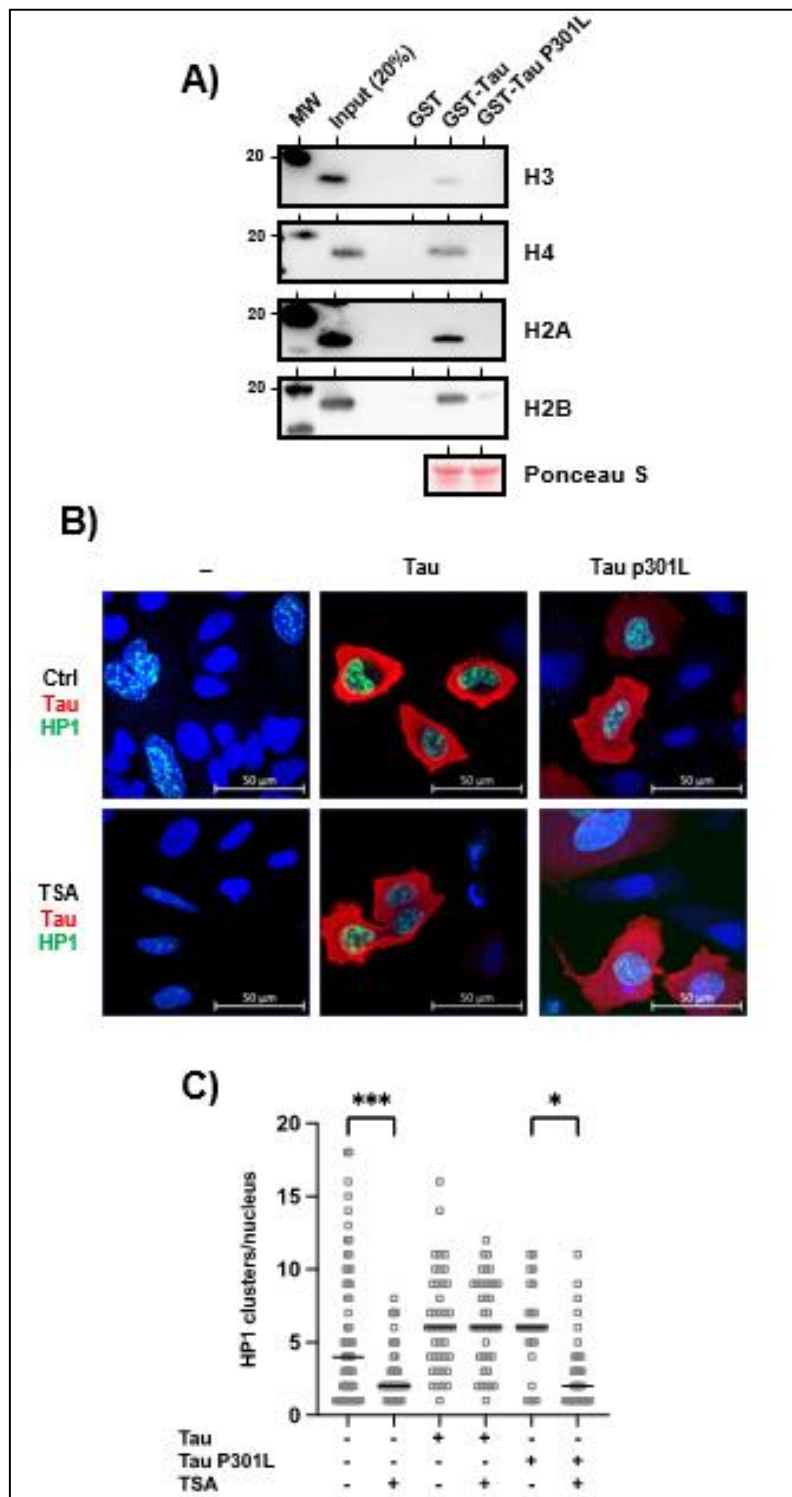
Naturally our next hypothesis then was that tau could be associated with chromatin through direct interaction with histones. To address this possibility, we first realized GST-pulldown analysis using unmodified core histones. As shown in Figure 5A, Tau4R but not GST alone bound specifically to the histone core as revealed by H3, H4, H2A and H2B antibodies. Using recombinant histones, we also showed that this interaction was mediated through H3 and/or H4 and not H2A and H2B (Figure 5B). We next tested the effect of different combination of H4 acetylation sites, not present in the H4 ELISA kit, on Tau4R interaction using synthetic H4 tail peptides. As seen in Figure 5C and D, Tau bound to unacetylated H4 and H4K5acK12ac. In contrast to H4K5ac, acetylation at K8 (H4K8) slightly increased Tau binding (2-fold over unacetylated H4). Tau binding was not further increased by acetylation at position 5 (H4K5acK8ac). We observed a 4-fold increase in Tau binding for diacetylated H4 at position 12 and 16. Again, no change was observed when adding an acetyl group at position 5. However, a 6-

fold increase was observed when using a tetra-acetylated H4. These results indicated that Tau binds H4 when unacetylated, but displays more affinity for tetra-acetylated H4.



**Figure 5. Tau4R binds directly to histones.** (A) Tau4R interacts with core histones. GST-pulldown experiments were carried out using GST (1  $\mu$ g) or GST-Tau4R (1  $\mu$ g) and purified core histones (1  $\mu$ g). Complexes were precipitated with Sepharose-glutathione beads, resolved by 12% SDS-PAGE and visualized by immunoblot analysis with antibodies against H3, H4, H2A and H2B. (B) Tau4R interacts with histone H3 and H4. GST-pulldown experiments were carried out using 1  $\mu$ g of GST or GST-Tau4R and 1  $\mu$ g of recombinant H3, H4, H2A or H2B. Complexes were precipitated with Sepharose-glutathione beads, resolved by 12% SDS-PAGE and visualized by immunoblot analysis with antibodies against H3, H4 H2A or H2B. (C) Histone H4 tail peptides tested for Tau binding. Tau protein bound to biotinylated synthetic H4 peptides was detected by immunoblot. A representative Western blot is shown and (D) is a quantification from three independent experiments. Data are mean $\pm$ SD \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001.

f. The frontotemporal lobar degeneration Tau mutation abolished Tau/histone interaction



**Figure 6. Frontotemporal lobar degeneration Tau mutations disrupt its interaction with histones.** (A) P301L mutation abolished Tau/histone interaction. GST-pulldown experiments were carried out using GST (1 μg), GST-Tau4R (1 μg) or GST-P301L (1 μg) and purified core histones (1 μg). Complexes were precipitated with Sepharose-glutathione beads, resolved by 12% SDS-PAGE and visualized by immunoblot analysis with antibodies against H3, H4, H2A and H2B. GST-Tau and GST-TauP301L loading was controlled by Ponceau red



staining. (B) Single confocal sections of HeLa cells transfected with GFP-HP1 $\beta$ , with or without Tau4R or TauP301L and treated 24h later with the TSA (300 nM) for 24h. Tau C-terminus antibodies and GFP fluorescence were used to visualize total Tau protein and HP1 $\beta$  respectively. Representative images are shown. (C) Quantification of HP1 $\beta$  clusters per nuclei visualized as described previously and realized on three independent experiments. Data are mean $\pm$ SD \*P<0.05 \*\*\*P<0.001.

Pericentromeric heterochromatin disruption was observed in neurons from frontotemporal lobar degeneration (Tau P301L/S) pathological models (Frost et al., 2014; Mansuroglu et al., 2016). These observations further suggest that P301L/S mutations, could nevertheless abolish Tau/histone interaction. To this end, we first performed GST-pulldown analysis using purified core histones. As shown previously, Tau interacted specifically with core histones as detected by H3, H4, H2A and H2B antibodies (Figure 6A). However, this interaction was greatly decreased by the TauP301L mutation. Based on these observations, we hypothesized that TauP301L mutant would not prevent HP1 spreading induced by TSA treatment. To test this, we next followed the fate of transfected GFP-HP1 $\beta$  in the absence or presence of transfected Tau4R or TauP301L mutant, following TSA treatment in HeLa cells, which as we have mentioned are devoid of endogenous Tau expression. As shown above, we observed a decrease in the number of HP1 clusters in control cells following TSA treatment. This decrease was prevented when wild-type Tau was expressed, but not by the Tau P301L mutant (Figure 6B and C). Taken together, these data demonstrated a direct relationship between Tau/histone interaction and TSA-induced chromatin remodeling.

#### g. Tau4R increases chromatin compaction

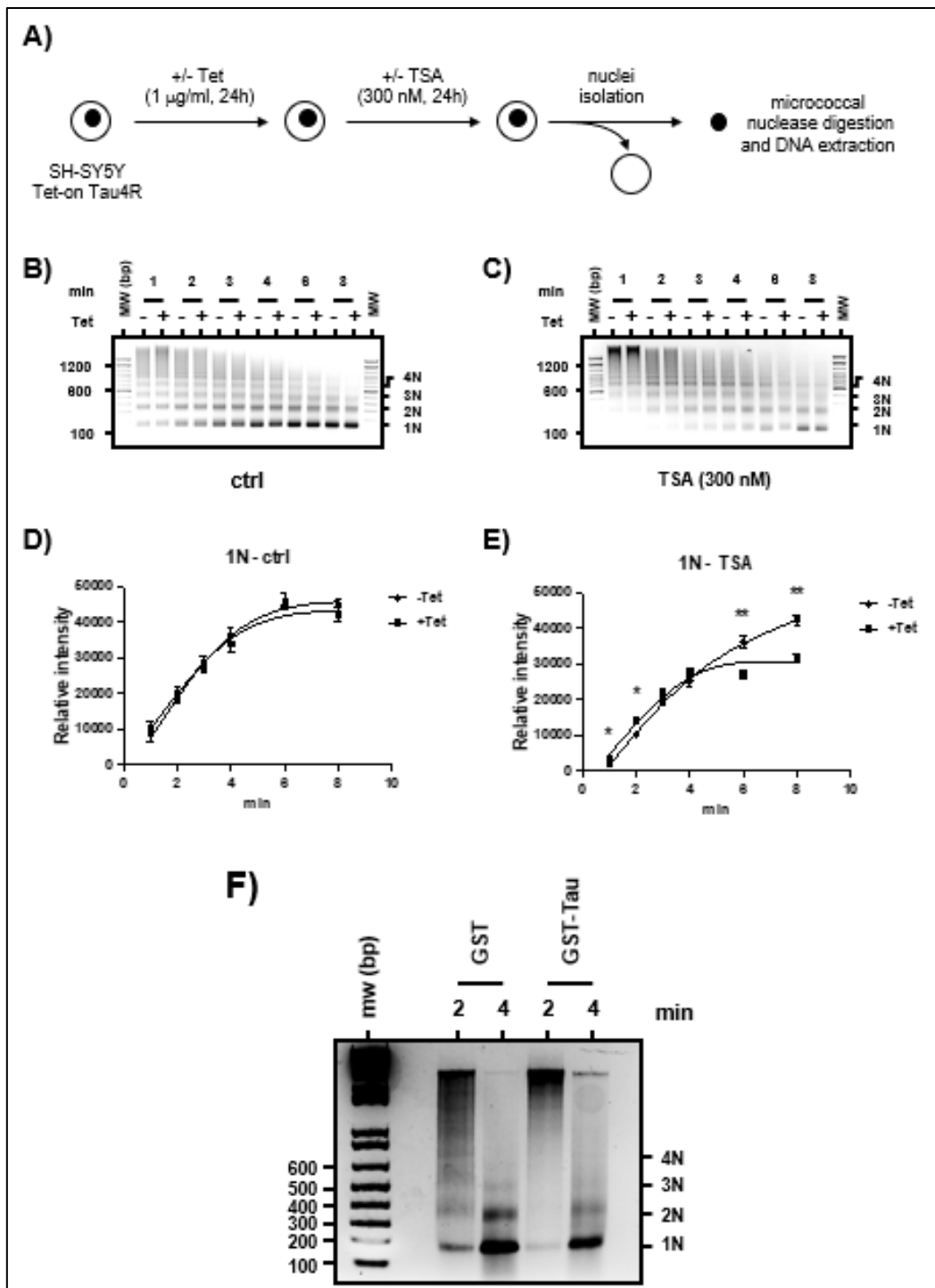
A possible mechanism of the inhibitory effect on H3 acetylation is that Tau4R binding to histone blocks acetylation by steric hindrance. To test this hypothesis, we next performed *in vitro* acetyltransferase assays using core histone, unmodified or H4 tetra-acetylated nucleosomes. However, no change in H3 or H4 acetylation level was observed in the absence or presence of recombinant Tau4R (supplementary Figure 5).

Another intriguing possible mechanism is that Tau4R binding to histones would induce chromatin compaction that prevent H3 acetylation. To address this question, we again used our micrococcal nuclease assay as the outcome is highly dependent on chromatin compaction. It has been shown that the

cleavage pattern as well as the rate of conversion of chromatin into smaller nucleosome fragments reflected the accessibility of linker DNA to the enzyme and overall compactness of chromatin (Bryant, 2012).

To probe the effect of Tau on chromatin structure, this time we performed the nuclease assay using different time points. To control Tau4R expression, we therefore used SH-SY5Y Tet-on Tau4R cells. We induced Tau4R expression with tetracycline and then added 300 nM TSA, 24h later (Figure 7A). Then, we subjected an equivalent number of isolated nuclei to micrococcal nuclease digestion for different times (1, 2, 3, 4, 6 and 8 min) and compared the abundance of nucleosomal DNA corresponding to mono-, di-, tri- and tetranucleosomes. In the absence of TSA, chromatin from control and Tau4R expressing cells cleaved in a similar pattern at a similar rate (Figure 7B, 7D supplementary Figure 6). Importantly however, TSA induced significant differences. There were less oligo-nucleosomes in Tau4R expressing cells, demonstrating that the chromatin was less accessible to micrococcal nuclease, meaning more compact, when Tau4R was present (Figure 7C, 7E supplementary Figure 6).

To confirm our results were not due to experimental artefacts in our cell lines, we next used *in vitro* reconstituted chromatin incubated with purified recombinant GST or GST-Tau4R proteins in a micrococcal nuclease assay. As shown in Figure 7F, digestion with GST alone for 2 min produced a ladder of DNA fragments, mostly corresponding to mono-, di-, tri- and tetra-nucleosomes whereas the longer incubation (4 min) gave rise mostly to mono and di-nucleosomes. Strikingly, when *in vitro* reconstituted chromatin was pre-incubated with purified GST-Tau4R, no ladder was observed after 2- or 4-min incubation with micrococcal nuclease, showing that chromatin in this condition was less accessible. These observations are consistent with a role of Tau4R in maintaining a compacted chromatin structure that prevents histone acetylation.



**Figure 7. Tau4R increases chromatin compaction.** (A) Schematic representation of the experimental procedure. Nucleosome ladders obtained after micrococcal nuclease digestion of SH-SY5Y Tet-on Tau4R cells treated or not with tetracycline (Tet, 1 µg/ml, 24h) then followed (B) or not (C) by TSA treatment (300 nM, 24h). Digested chromatin was analysed on a 1.5% agarose gel and revealed by ethidium bromide staining. Mono-, di-, tri and tetra-nucleosomes are indicated on the right. One representative experiment out of three is shown. (D) and (E) Densitometric analysis of the 1N fragments obtained in control (B) and TSA-treated conditions (C) were calculated from three independent experiments. Data are mean±SD \*P<0.05 \*\*P<0.01. (F) Tau4R reduces chromatin template accessibility to micrococcal nuclease in vitro. Reconstituted nucleosomal

arrays were incubated with 3 µg of GST or GST-Tau4R and subjected to micrococcal nuclease digestion for 2 or 4 minutes. Purified DNA fragments were then run on a 1.5% agarose gel in 0.5x TBE buffer and revealed by ethidium bromide staining. Mono-, di-, tri and tetra-nucleosomes are indicated on the right. One representative experiment out of three is shown.

#### 4. Discussion

An extensive body of literature suggested a possible role of Tau in chromatin functions and/or organization in neuronal, non-neuronal cells and cancer cells (Frost et al., 2014; Bukar Maina et al., 2016; Bou Samra et al., 2017; Klein et al., 2019). However, a clear mechanism has not been demonstrated. Here we show that Tau preferentially binds to the condensed nuclease-resistant chromatin fraction devoid of any silent specific histone methylation. In addition, we demonstrated that Tau binding to histones is direct, involving unmodified histone H3 and H4 or tetra-acetylated H4 that increased interaction. As consequences, Tau 4R stabilizes condensed chromatin and heterochromatin.

Our results point out that Tau expression itself does not induce broad changes in chromatin organization/structure (e.g. chromatin accessibility, pericentromeric heterochromatin integrity and histone acetylation) and the effect of Tau was seen only when deacetylation was inhibited. These data suggest a more general role for Tau in preventing chromatin remodeling. In this regard, we found the same results using BIX 01294, a specific inhibitor of G9a histone methyltransferase catalyzing the dimethylated state of H3 at lysine 9 and known to disrupt pericentromeric heterochromatin (Kubicek et al., 2007) (supplementary Figure 7). Most strikingly, associated histones were devoid of any H3K9me2/3, a hallmark of heterochromatin. We found that Tau4R was able to maintain PCH structure irrespectively of the observed decrease in H3K9me2 induced by TSA or BIX 01294, suggesting an indirect role for Tau4R in maintaining PCH and heterochromatin integrity. The mechanism by which TSA reduced the level of this epigenetic mark remains unknown but has been reported previously (Fukuda et al., 2015). In a drosophila model of tauopathy, heterochromatin disruption was hypothesized to be a consequence of oxidative stress/DNA damage and this effect could not be prevented by aggregated Tau proteins. Interestingly, there is now evidence suggesting that oxidative stress globally influences chromatin structure and enzymatic post-translational modifications of histones (Kreuz and Fischle, 2016). These observations suggest that loss of Tau function and chromatin remodeling act at the initial step of the pathology.

In *Drosophila*, global changes in gene expression have been also observed, indicating chromatin remodeling is not limited to pericentromeric heterochromatin structure. These observations were recapitulated in part in our cellular models. Trichostatin-induced gene expression was higher in cellular MCF7 models depleted of endogenous Tau for GADD45a and p21, two well-characterized histone deacetylase-inhibitor-inducible genes. In addition, luciferase reporter activation was observed after trichostatin A treatment and decreased in the presence of GAL4-tethered or wild-type Tau4R proteins. Note also that we did not observe an effect of GAL-Tau4R when the GAL4UAS responsive luciferase reporter HeLa stable cell line displayed a high basal luciferase, representing state associated with active chromatin (supplementary Figure 8). This observation suggests that Tau4R was unable to repress gene expression on active genes but rather maintains the condensed chromatin state.

Our results clearly demonstrated that Tau was mostly associated with condensed chromatin, where associated histones were devoid of any H3 post-translational modifications and could present in particular H4 acetylation marks. Our *in vitro* experiments demonstrate that Tau4R binds to unmodified core histones, but the affinity increased with H4 acetylation. Using genome-wide chromatin immunoprecipitation followed by microarray hybridization assays in primary neuronal culture, Benhelli-mokrani et al. suggested that an AG-rich GAGA-like DNA motif could play a role in Tau genomic localization (Benhelli-Mokrani et al., 2018). However, we found no correlation between the presence of GAGA sequences and Tau binding (supplementary Table 1). Our observation is more consistent with a previous report demonstrating that Tau DNA binding is sequence independent, involving just the DNA backbone (Qi et al., 2015). Sequence-independent DNA binding cannot explain the observed specific genomic distribution observed by Benhelli-Mokrani. The interaction with histones and nucleosome core particles we reveal likely confer additional specificity for Tau binding to chromatin.

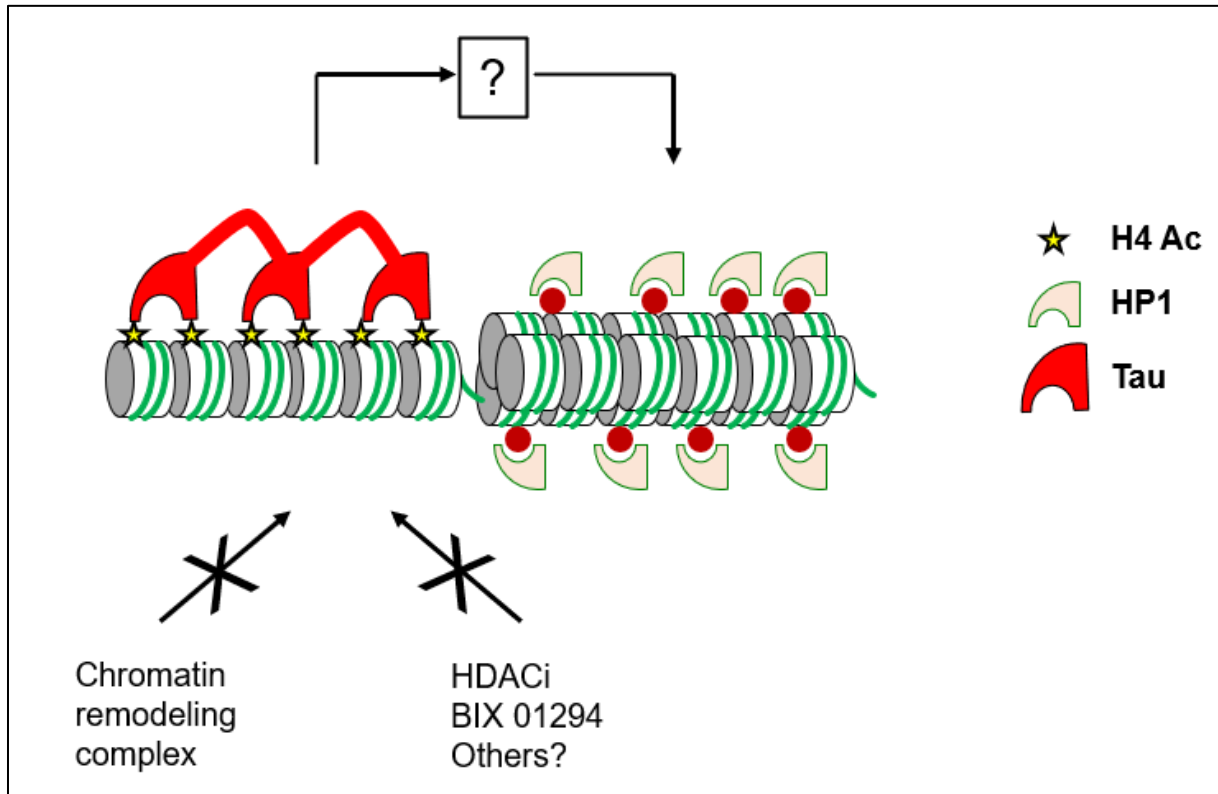
The exact modality of Tau4R binding to histones H3 and H4 remains to be identified, since no structural similarities with other histone associated proteins were found. Since we did not observe any chromatin association with the Tau3R isoforms, we suspect an essential role of the second microtubule domain encoded by the exon 10 in the recognition process. This observation is reinforced by the loss of Tau/histone interaction observed with the P301L mutant. The mutation occurs within exon 10 and only affects Tau4R isoform, exon 10 being splice out of 3R isoforms (Sergeant et al., 2005). Note that the TauP301L/S mutations do not interfere with Tau nuclear localization (Siano et al., 2019).

Although Tau contains an intrinsic acetyltransferase activity, it did not appear to contribute directly to this specific acetylation pattern as demonstrated by our *in vitro* acetyltransferase assays (Cohen et al., 2013). It was quite surprising to find H4K16 acetylation in these nuclease resistant fractions, as this is a histone post-translational modification known to contribute directly to chromatin decompaction (Shogren-Knaak et al., 2006; Yu et al., 2011). However, there is substantial evidence that H4K16 acetylation does not alter higher chromatin compaction *in vivo* but rather it disrupts local chromatin structure (Taylor et al., 2013; Mishra et al., 2016). In addition, H4 acetylation has been detected in some heterochromatin compartments (Turner et al., 1992; Johnson et al., 1998). Most strikingly, our results show that Tau associated histones were devoid of the H3K9me<sub>2/3</sub> hallmark of heterochromatin. This further suggests an indirect role for Tau4R in maintaining heterochromatin integrity.

Our results presented here indicate that Tau binding specifically inhibits H3 acetylation in cellulo, as shown for the p21 promoter (distal and proximal) in MCF7 cells and for the GAL4UAS responsive luciferase reporter in HeLa cells. Tau was not detected at the level of p21 transcription start site, a region shown to be enriched in H3K4me<sub>3</sub>, which supports our idea that post-translational modification of H3 prevents Tau binding (Itahana et al., 2016). However, this effect was not seen not for nucleosomes or histones *in vitro*. On the balance of the data presented here we feel that the chromatin's condensation state prevents chromatin remodeling complexes accessing histones. Although our experiments demonstrate that histone acetylation is inhibited by Tau, other post-translational modifications of H3 are also likely inhibited as there are not seen in our streptavidin pull-down assay.

As a consequence of a cellular role of Tau in chromatin organization and/or function, we showed that Tau4R depletion in the luminal MCF7 or triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cell lines increased TSA-induced cell death and apoptosis. Previous studies demonstrated that histone deacetylase-inhibitors led in particular to the up-regulation of pro-apoptotic genes (Li and Seto, 2016). We found that GADD45a, a gene that may be involved in apoptosis, was more expressed in MCF7shTau cells after TSA treatment (Takekawa and Saito, 1998; Zhang et al., 2001). Although p21 is known to be induced by inhibiting histone deacetylases, it is not clearly known how it controls the resulting apoptosis, although p21 can induced G1 arrest. Depending on the cellular model, G1 arrest could be protective or necessary for TSA-induced apoptosis (Peart et al., 2005) (Newbold et al., 2014). In this regard, we found no correlation between p21 expression, G1 arrest and the extent of apoptosis in MCF7 and MDA-MB-231 short hairpin cells.

In conclusion, this is the first study describing a role and underlying mechanism of Tau protein in chromatin structure and opens new avenues to further understand Tau biology in neuronal and cancer cells.



**Figure 8. Proposed model for the role of Tau on chromatin.** Tau binds to condensed chromatin regions through the interaction with unmodified histone H3, H4 or acetylated H4. The interaction between Tau and histones maintains the condensed chromatin state and prevents chromatin remodeling complexes accessing histones and gene expression. By an indirect mechanism, Tau also prevents heterochromatin decompaction and HP1s spreading induced by chromatin remodeling agents such as TSA, BIX 01294 and possibly others.

## **AUTHORS CONTRIBUTIONS**

BL designed the research; TR, MG, AC, TC, MC, HD, FP and BL performed the experiments. RM and XT performed the microscale thermophoresis experiments and analyzed the data. TR, MG, AC, FP, LB and BL analyzed data; BL wrote the manuscript with the input of LB and M-CG.



## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **FUNDING**

This work was supported by the Labex (Excellence Laboratory), DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer's Disease), and by INSTALZ, an EU Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research (JPND) project. The project is supported through the following funding organization under the aegis of JPND - France, Agence Nationale de la Recherche.

The project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 643417. BL is supported by the Ligue contre le Cancer (comité du Nord).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank T. Misteli (NCI, NIH, Bethesda, USA), J.C. Lambert (INSERM U1167, Lille, France) and C. Smet-Nocca (UMR8576, Villeneuve d'Ascq, France) for the gift of plasmids. We thank Raphaelle Caillierez, Lucie Delattre and Margot Loones for excellent technical assistance. We are grateful to the UMS-2014 US41 PLBS for access to the confocal microscopy Platform. We thank Dr J. Eeckhoutte (INSERM U1011, Lille, France), Dr V. Mattot (UMR-S 1172, Lille, France), Dr E. Adriaenssen (UMR-S1277, Villeneuve d'Ascq, France) and members of the UMR-S1172, Alzheimer & Tauopathies for critical reading of the manuscript.

## 5. References

- Ahanger, S.H., Gunther, K., Weth, O., Bartkuhn, M., Bhone, R.R., Shouche, Y.S., and Renkawitz, R. (2014). Ectopically tethered CP190 induces large-scale chromatin decondensation. *Sci Rep* 4, 3917.
- Allis, C.D., and Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* 17, 487-500.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., and Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84, 361-384.
- Benhelli-Mokrani, H., Mansuroglu, Z., Chauderlier, A., Albaud, B., Gentien, D., Sommer, S., Schirmer, C., Laqueuvre, L., Josse, T., Buee, L., Lefebvre, B., Galas, M.C., Soues, S., and Bonnefoy, E. (2018). Genome-wide identification of genic and intergenic neuronal DNA regions bound by Tau protein under physiological and stress conditions. *Nucleic Acids Res* 46, 11405-11422.
- Bou Samra, E., Buhagiar-Labarchede, G., Machon, C., Guitton, J., Onclercq-Delic, R., Green, M.R., Alibert, O., Gazin, C., Veaute, X., and Amor-Gueret, M. (2017). A role for Tau protein in maintaining ribosomal DNA stability and cytidine deaminase-deficient cell survival. *Nat Commun* 8, 693.
- Bryant, G.O. (2012). Measuring nucleosome occupancy in vivo by micrococcal nuclease. *Methods Mol Biol* 833, 47-61.
- Bukar Maina, M., Al-Hilaly, Y.K., and Serpell, L.C. (2016). Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease. *Biomolecules* 6, 9.
- Bustos, M.A., Salomon, M.P., Nelson, N., Hsu, S.C., Dinome, M.L., Hoon, D.S., and Marzese, D.M. (2017). Genome-wide chromatin accessibility, DNA methylation and gene expression analysis of histone deacetylase inhibition in triple-negative breast cancer. *Genom Data* 12, 14-16.
- Chauderlier, A., Gilles, M., Spolcova, A., Caillierez, R., Chwastyniak, M., Kress, M., Drobecq, H., Bonnefoy, E., Pinet, F., Weil, D., Buee, L., Galas, M.C., and Lefebvre, B. (2018). Tau/DDX6

- interaction increases microRNA activity. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1861, 762-772.
- Cohen, T.J., Friedmann, D., Hwang, A.W., Marmorstein, R., and Lee, V.M. (2013). The microtubule-associated tau protein has intrinsic acetyltransferase activity. *Nat Struct Mol Biol* 20, 756-762.
- Cowell, I.G., Papageorgiou, N., Padget, K., Watters, G.P., and Austin, C.A. (2011). Histone deacetylase inhibition redistributes topoisomerase IIbeta from heterochromatin to euchromatin. *Nucleus* 2, 61-71.
- Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J., and Feany, M.B. (2014). Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nat Neurosci* 17, 357-366.
- Fukuda, T., Wu, W., Okada, M., Maeda, I., Kojima, Y., Hayami, R., Miyoshi, Y., Tsugawa, K., and Ohta, T. (2015). Class I histone deacetylase inhibitors inhibit the retention of BRCA1 and 53BP1 at the site of DNA damage. *Cancer Sci* 106, 1050-1056.
- Galas, M.C., Dourlen, P., Begard, S., Ando, K., Blum, D., Hamdane, M., and Buee, L. (2006). The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *J Biol Chem* 281, 19296-19304.
- Gargini, R., Segura-Collar, B., and Sanchez-Gomez, P. (2019). Novel Functions of the Neurodegenerative-Related Gene Tau in Cancer. *Front Aging Neurosci* 11, 231.
- Glaser, K.B., Staver, M.J., Waring, J.F., Stender, J., Ulrich, R.G., and Davidsen, S.K. (2003). Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2, 151-163.
- Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2000). Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502, 110-121.
- Gorsch, S.M., Wachsmuth, M., Toth, K.F., Lichter, P., and Rippe, K. (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J Cell Sci* 118, 5825-5834.

- Henikoff, S., Henikoff, J.G., Sakai, A., Loeb, G.B., and Ahmad, K. (2009). Genome-wide profiling of salt fractions maps physical properties of chromatin. *Genome Res* 19, 460-469.
- Hirose, T., Sowa, Y., Takahashi, S., Saito, S., Yasuda, C., Shindo, N., Furuichi, K., and Sakai, T. (2003). p53-independent induction of Gadd45 by histone deacetylase inhibitor: coordinate regulation by transcription factors Oct-1 and NF-Y. *Oncogene* 22, 7762-7773.
- Itahana, Y., Zhang, J., Goke, J., Vardy, L.A., Han, R., Iwamoto, K., Cukuroglu, E., Robson, P., Pouladi, M.A., Colman, A., and Itahana, K. (2016). Histone modifications and p53 binding poise the p21 promoter for activation in human embryonic stem cells. *Sci Rep* 6, 28112.
- Johnson, C.A., O'Neill, L.P., Mitchell, A., and Turner, B.M. (1998). Distinctive patterns of histone H4 acetylation are associated with defined sequence elements within both heterochromatic and euchromatic regions of the human genome. *Nucleic Acids Res* 26, 994-1001.
- Klein, H.U., McCabe, C., Gjonneska, E., Sullivan, S.E., Kaskow, B.J., Tang, A., Smith, R.V., Xu, J., Pfenning, A.R., Bernstein, B.E., Meissner, A., Schneider, J.A., Mostafavi, S., Tsai, L.H., Young-Pearse, T.L., Bennett, D.A., and De Jager, P.L. (2019). Epigenome-wide study uncovers large-scale changes in histone acetylation driven by tau pathology in aging and Alzheimer's human brains. *Nat Neurosci* 22, 37-46.
- Kreuz, S., and Fischle, W. (2016). Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenomics* 8, 843-862.
- Kubicek, S., O'sullivan, R.J., August, E.M., Hickey, E.R., Zhang, Q., Teodoro, M.L., Rea, S., Mechtler, K., Kowalski, J.A., Homon, C.A., Kelly, T.A., and Jenuwein, T. (2007). Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase. *Mol Cell* 25, 473-481.
- Lebouvier, T., Pasquier, F., and Buee, L. (2017). Update on tauopathies. *Curr Opin Neurol* 30, 589-598.

- Lefebvre, B., Brand, C., Flajollet, S., and Lefebvre, P. (2006). Down-regulation of the tumor suppressor gene retinoic acid receptor beta2 through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Endocrinol* 20, 2109-2121.
- Lei, C., Yang, C., Xia, B., Ji, F., Zhang, Y., Gao, H., Xiong, Q., Lin, Y., Zhuang, X., Zhang, L., Zhu, T., Cheng, M., Yang, M., and Wang, K. (2020). Analysis of Tau Protein Expression in Predicting Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *J Breast Cancer* 23, 47-58.
- Li, Y., Danzer, J.R., Alvarez, P., Belmont, A.S., and Wallrath, L.L. (2003). Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development* 130, 1817-1824.
- Li, Y., and Seto, E. (2016). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6.
- Li, Z.H., Xiong, Q.Y., Tu, J.H., Gong, Y., Qiu, W., Zhang, H.Q., Wei, W.S., Hou, Y.F., and Cui, W.Q. (2013). Tau proteins expressions in advanced breast cancer and its significance in taxane-containing neoadjuvant chemotherapy. *Med Oncol* 30, 591.
- Lichota, J., and Grasser, K.D. (2001). Differential chromatin association and nucleosome binding of the maize HMGA, HMGB, and SSRP1 proteins. *Biochemistry* 40, 7860-7867.
- Lippens, G., Wieruszeski, J.M., Leroy, A., Smet, C., Sillen, A., Buee, L., and Landrieu, I. (2004). Proline-directed random-coil chemical shift values as a tool for the NMR assignment of the tau phosphorylation sites. *Chembiochem* 5, 73-78.
- Lu, M., and Kosik, K.S. (2001). Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell* 12, 171-184.
- Mansuroglu, Z., Benhelli-Mokrani, H., Marcato, V., Sultan, A., Violet, M., Chauderlier, A., Delattre, L., Loyens, A., Talahari, S., Begard, S., Nessler, F., Colin, M., Soues, S., Lefebvre, B., Buee, L., Galas, M.C., and Bonnefoy, E. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Sci Rep* 6, 33047.

- Marchion, D.C., Bicaku, E., Daud, A.I., Sullivan, D.M., and Munster, P.N. (2005). Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 65, 3815-3822.
- Matrone, M.A., Whipple, R.A., Thompson, K., Cho, E.H., Vitolo, M.I., Balzer, E.M., Yoon, J.R., Ioffe, O.B., Tuttle, K.C., Tan, M., and Martin, S.S. (2010). Metastatic breast tumors express increased tau, which promotes microtentacle formation and the reattachment of detached breast tumor cells. *Oncogene* 29, 3217-3227.
- Mishra, L.N., Pepenella, S., Rogge, R., Hansen, J.C., and Hayes, J.J. (2016). Acetylation Mimics Within a Single Nucleosome Alter Local DNA Accessibility In Compacted Nucleosome Arrays. *Sci Rep* 6, 34808.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., McMullan, C.J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Hideshima, T., Akiyama, M., Chauhan, D., Munshi, N., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T.A., Richon, V.M., Marks, P.A., and Anderson, K.C. (2004). Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 540-545.
- Morgan, M.A., and Shilatifard, A. (2015). Chromatin signatures of cancer. *Genes Dev* 29, 238-249.
- Newbold, A., Falkenberg, K.J., Prince, H.M., and Johnstone, R.W. (2016). How do tumor cells respond to HDAC inhibition? *FEBS J* 283, 4032-4046.
- Newbold, A., Salmon, J.M., Martin, B.P., Stanley, K., and Johnstone, R.W. (2014). The role of p21(waf1/cip1) and p27(Kip1) in HDACi-mediated tumor cell death and cell cycle arrest in the Emu-myc model of B-cell lymphoma. *Oncogene* 33, 5415-5423.
- Payao, S.L., Smith, M.D., and Bertolucci, P.H. (1998). Differential chromosome sensitivity to 5-azacytidine in Alzheimer's disease. *Gerontology* 44, 267-271.
- Peart, M.J., Smyth, G.K., Van Laar, R.K., Bowtell, D.D., Richon, V.M., Marks, P.A., Holloway, A.J., and Johnstone, R.W. (2005). Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3697-3702.

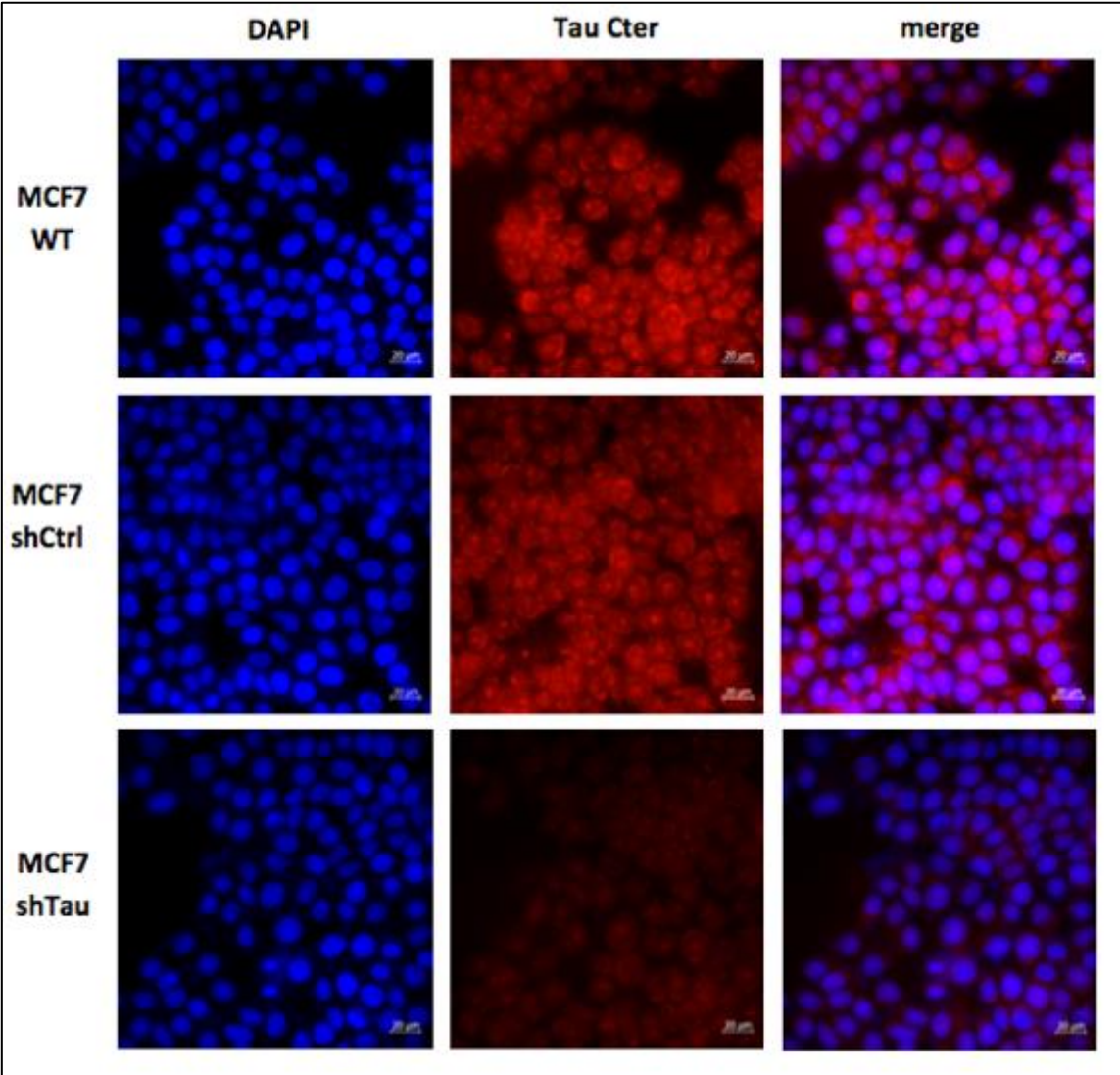


- Qi, H., Cantrelle, F.X., Benhelli-Mokrani, H., Smet-Nocca, C., Buee, L., Lippens, G., Bonnefoy, E., Galas, M.C., and Landrieu, I. (2015). Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of interaction of Tau with DNA and its regulation by phosphorylation. *Biochemistry* 54, 1525-1533.
- Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A., and Marks, P.A. (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10014-10019.
- Robbins, A.R., Jablonski, S.A., Yen, T.J., Yoda, K., Robey, R., Bates, S.E., and Sackett, D.L. (2005). Inhibitors of histone deacetylases alter kinetochore assembly by disrupting pericentromeric heterochromatin. *Cell Cycle* 4, 717-726.
- Rossi, G., Redaelli, V., Perego, P., Ferrari, R., Giaccone, G., and Tagliavini, F. (2018). Tau Mutations as a Novel Risk Factor for Cancer-Response. *Cancer Res* 78, 6525.
- Rouzier, R., Rajan, R., Wagner, P., Hess, K.R., Gold, D.L., Stec, J., Ayers, M., Ross, J.S., Zhang, P., Buchholz, T.A., Kuerer, H., Green, M., Arun, B., Hortobagyi, G.N., Symmans, W.F., and Puztai, L. (2005). Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8315-8320.
- Sergeant, N., Delacourte, A., and Buee, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 179-197.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-847.
- Siano, G., Caiazza, M.C., Olla, I., Varisco, M., Madaro, G., Quercioli, V., Calvello, M., Cattaneo, A., and Di Primio, C. (2019). Identification of an ERK Inhibitor as a Therapeutic Drug Against Tau Aggregation in a New Cell-Based Assay. *Front Cell Neurosci* 13, 386.

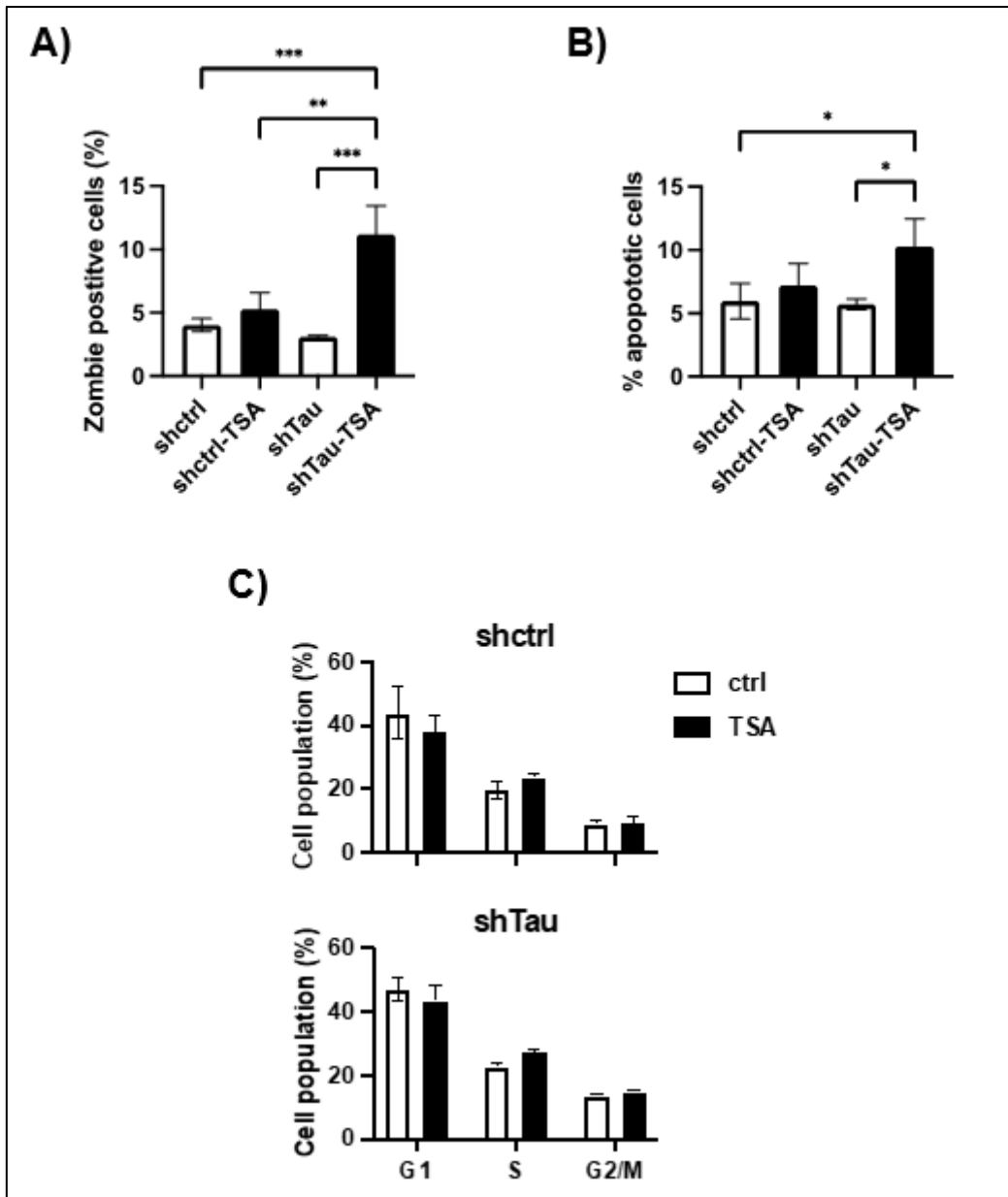
- Sjoberg, M.K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B., and Bonnefoy, E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 119, 2025-2034.
- Smoter, M., Bodnar, L., Duchnowska, R., Stec, R., Grala, B., and Szczylik, C. (2011). The role of Tau protein in resistance to paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol* 68, 553-557.
- Sotiropoulos, I., Galas, M.C., Silva, J.M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M.B., Blum, D., Sayas, C.L., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., Spillantini, M.G., Sousa, N., Avila, J., Medina, M., Mudher, A., and Buee, L. (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol Commun* 5, 91.
- Spicakova, T., O'brien, M.M., Duran, G.E., Sweet-Cordero, A., and Sikic, B.I. (2010). Expression and silencing of the microtubule-associated protein Tau in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 9, 2970-2981.
- Sun, W., Samimi, H., Gamez, M., Zare, H., and Frost, B. (2018). Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies. *Nat Neurosci* 21, 1038-1048.
- Taddei, A., Maison, C., Roche, D., and Almouzni, G. (2001). Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* 3, 114-120.
- Takekawa, M., and Saito, H. (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 95, 521-530.
- Taylor, G.C., Eskeland, R., Hekimoglu-Balkan, B., Pradeepa, M.M., and Bickmore, W.A. (2013). H4K16 acetylation marks active genes and enhancers of embryonic stem cells, but does not alter chromatin compaction. *Genome Res* 23, 2053-2065.
- Teves, S.S., and Henikoff, S. (2012). Salt fractionation of nucleosomes for genome-wide profiling. *Methods Mol Biol* 833, 421-432.

- Toth, K.F., Knoch, T.A., Wachsmuth, M., Frank-Stohr, M., Stohr, M., Bacher, C.P., Muller, G., and Rippe, K. (2004). Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* 117, 4277-4287.
- Turner, B.M., Birley, A.J., and Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69, 375-384.
- Wagner, P., Wang, B., Clark, E., Lee, H., Rouzier, R., and Puszta, L. (2005). Microtubule Associated Protein (MAP)-Tau: a novel mediator of paclitaxel sensitivity in vitro and in vivo. *Cell Cycle* 4, 1149-1152.
- Wang, Y., and Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* 17, 5-21.
- Yu, Q., Olsen, L., Zhang, X., Boeke, J.D., and Bi, X. (2011). Differential contributions of histone H3 and H4 residues to heterochromatin structure. *Genetics* 188, 291-308.
- Zhang, W., Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2001). Ectopic expression of MyD118/Gadd45/CR6 (Gadd45beta/alpha/gamma) sensitizes neoplastic cells to genotoxic stress-induced apoptosis. *Int J Oncol* 18, 749-757.

SUPPLEMENTARY DATA



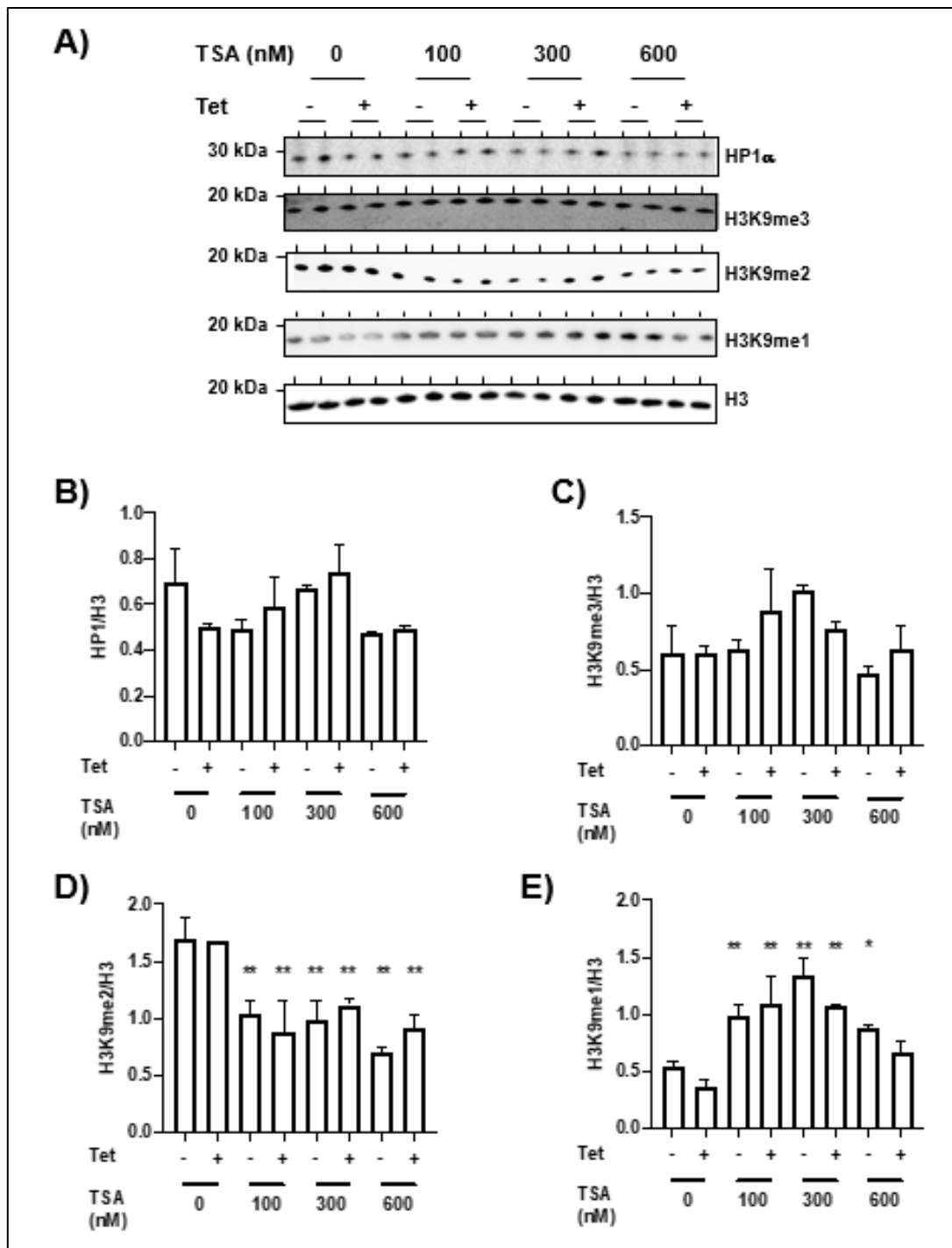
Supplementary figure 1. Single confocal sections of MCF7 wt, MCF7 stably transfected with plasmids encoding shctrl or shTau. Tau C-ter antibody was used to visualize total Tau protein. Representative images are shown.



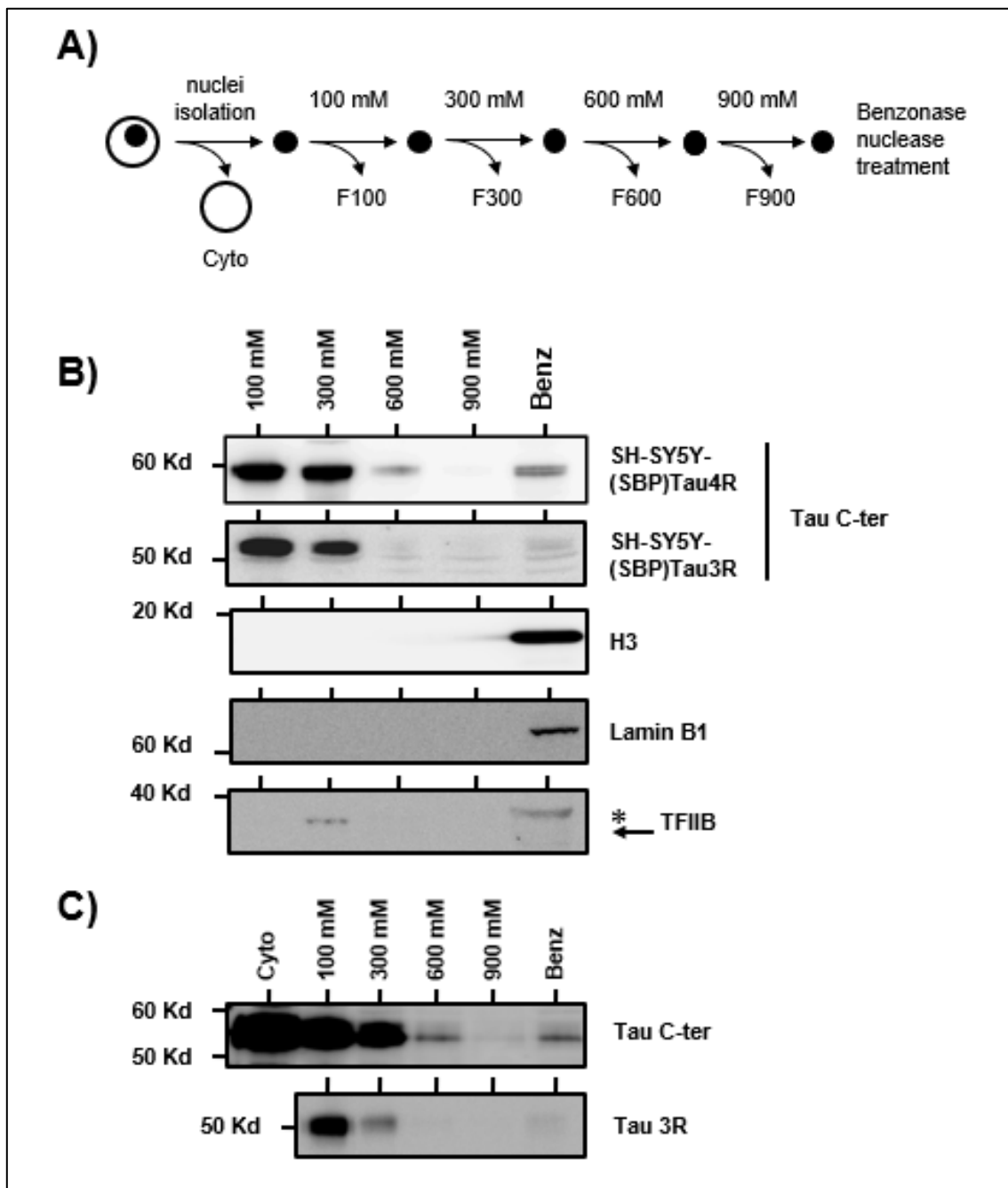
**Supplementary figure 2. Tau inhibition increases MDA-MB-231 breast cancer cell line sensitivity to TSA.**

(A) Effect of 100 nM TSA treatment (48h) on cell death in MDA-MB-231shctrl and MDA-MB-231 shTau subclones. Cell death was determined by zombie staining and flow cytometric analysis as described in the materials and methods. (B) Effect of 100 nM TSA treatment (48h) on apoptosis in in MDA-MB-231shctrl and MDA-MB-231shTau subclones. Apoptosis was determined by flow cytometric analysis of the PI-positive and Annexin-V-positive cells as described in the materials and methods. (D) Cell cycle distribution was determined by FACS analysis of combined propidium iodide and EdU staining in MDA-MB-231shctrl and MDA-MB-231shTau subclones in the absence or presence of 100 nM TSA, 48h. Data are mean±SD. \*P<0.05\*\*\*P<0.001.

All results are representative of three independent experiments.

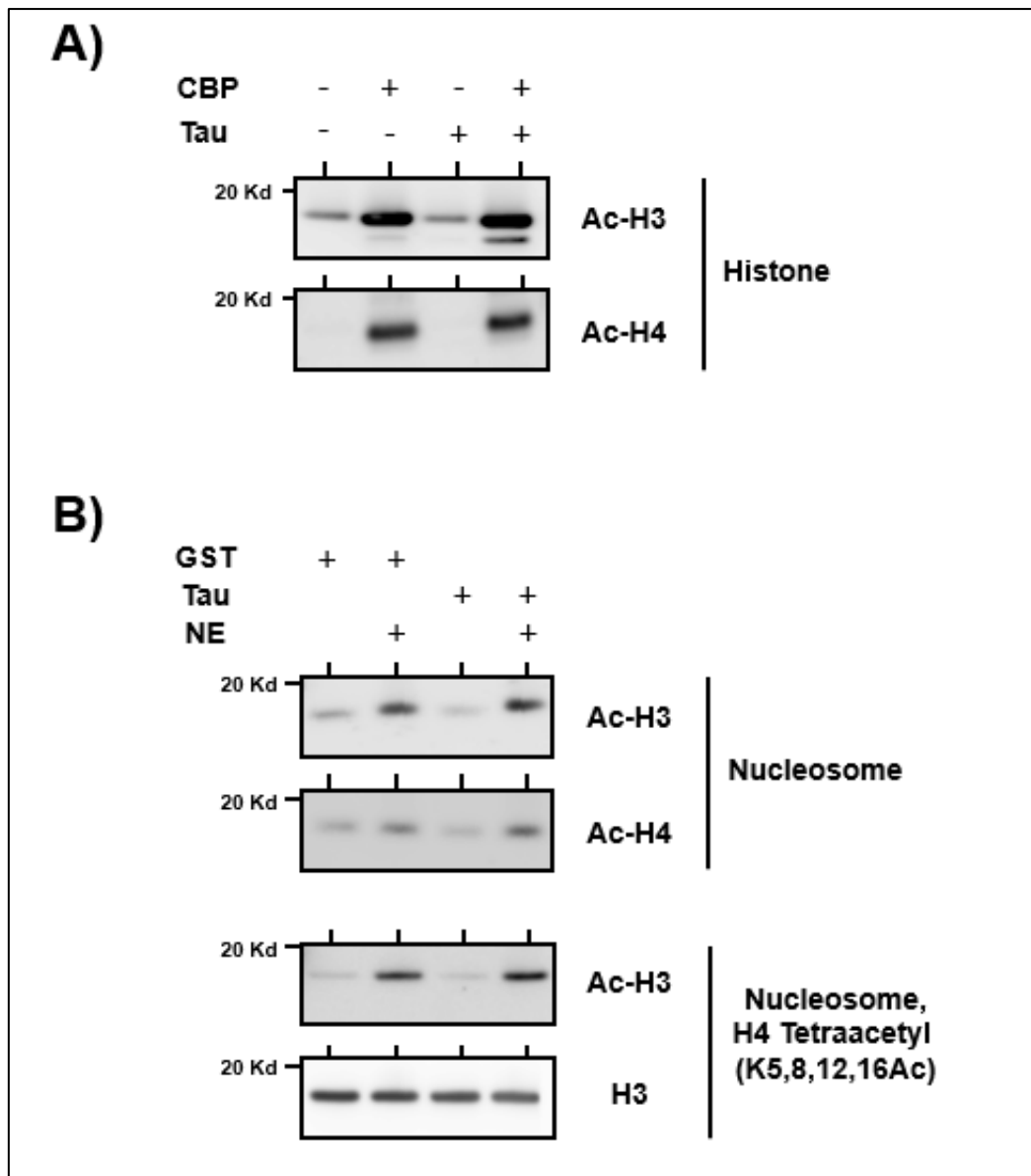


**Supplementary figure 3. Rate of H3K9 methylation and HP1a expression after TSA treatment.** (A) Western-blot analysis of HP1a, H3K9me3, H3K9me2 and H3K9me1 in SH-SY5Y Tet-on Tau4R cells following TSA treatment. Proteins from whole cell extracts were resolved on 12% SDS-PAGE and visualized by immunoblot analysis with antibodies against HP1a, H3K9me2, H3K9me 3 and H3 antibodies. Quantification of HP1a (B), H3K9me3 (C), H3K9me2 (D) and H3K9me1 (E) in SH-SY5Y Tet-on Tau4R cells following TSA treatment revealed no difference between control and TSA treated cells. Data are mean $\pm$ s.e.m. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control.



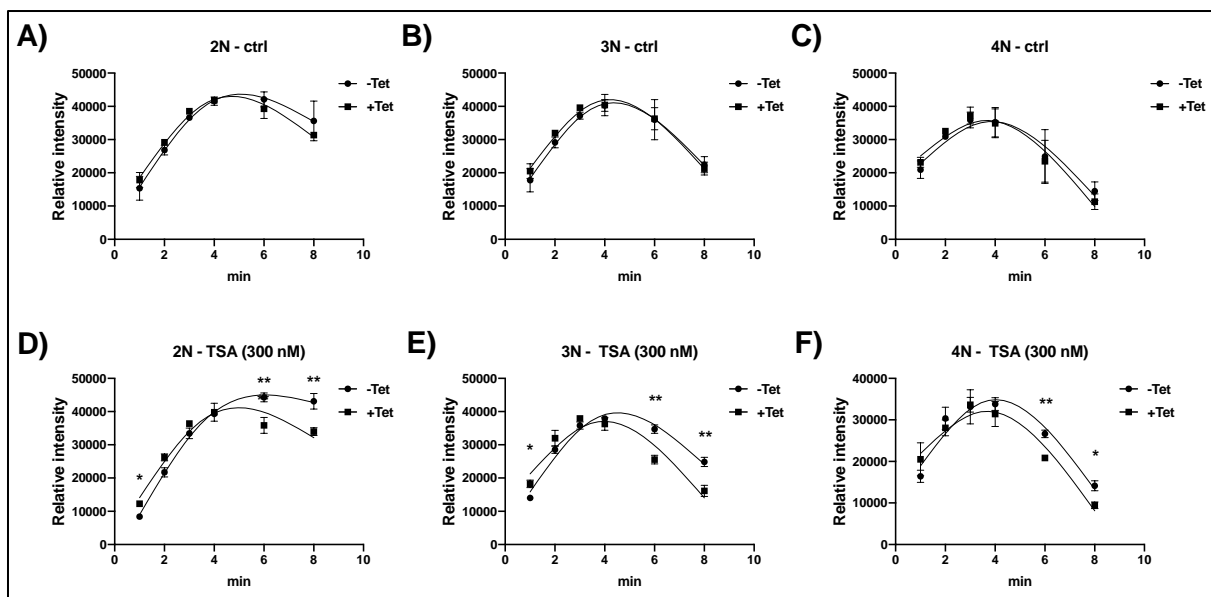
**Supplementary figure 4. Tau4R but not Tau3R isoforms are tightly bound to chromatin.** (A) Schematic representation of cells fractionation steps. Nuclei were isolated and extracted successively with the indicated NaCl concentration. The final pellet was digested with Benzonase nuclease. (B) Solubility of Tau4R and 3R in differential salt extraction. Nuclei of stably transfected SH-SY5Y with Tau4R (SH-SY5Y-(SBP) Tau4R) or Tau3R (SH-SY5Y-(SBP) Tau3R) isoforms fused in frame with the streptavidin binding peptide (SBP) were extracted as indicated in A) and Tau was detected by immunoblot using Tau C-ter antibody. Representative blots obtained for SH-SY5Y-(SBP) Tau4R or SH-SY5Y-(SBP) Tau3R cells of protein controls known to be associated with the different fractions (Lamin B1 for the chromatin fraction/nuclear matrix fraction; TFIIB for

the nuclear fraction, \* nonspecific band). (B) Endogenous Tau isoforms were extracted from primary neuronal cells as described in (A) and detected using Tau C-ter antibody or specific to 3R isoforms. All results are representative of three independent experiments.

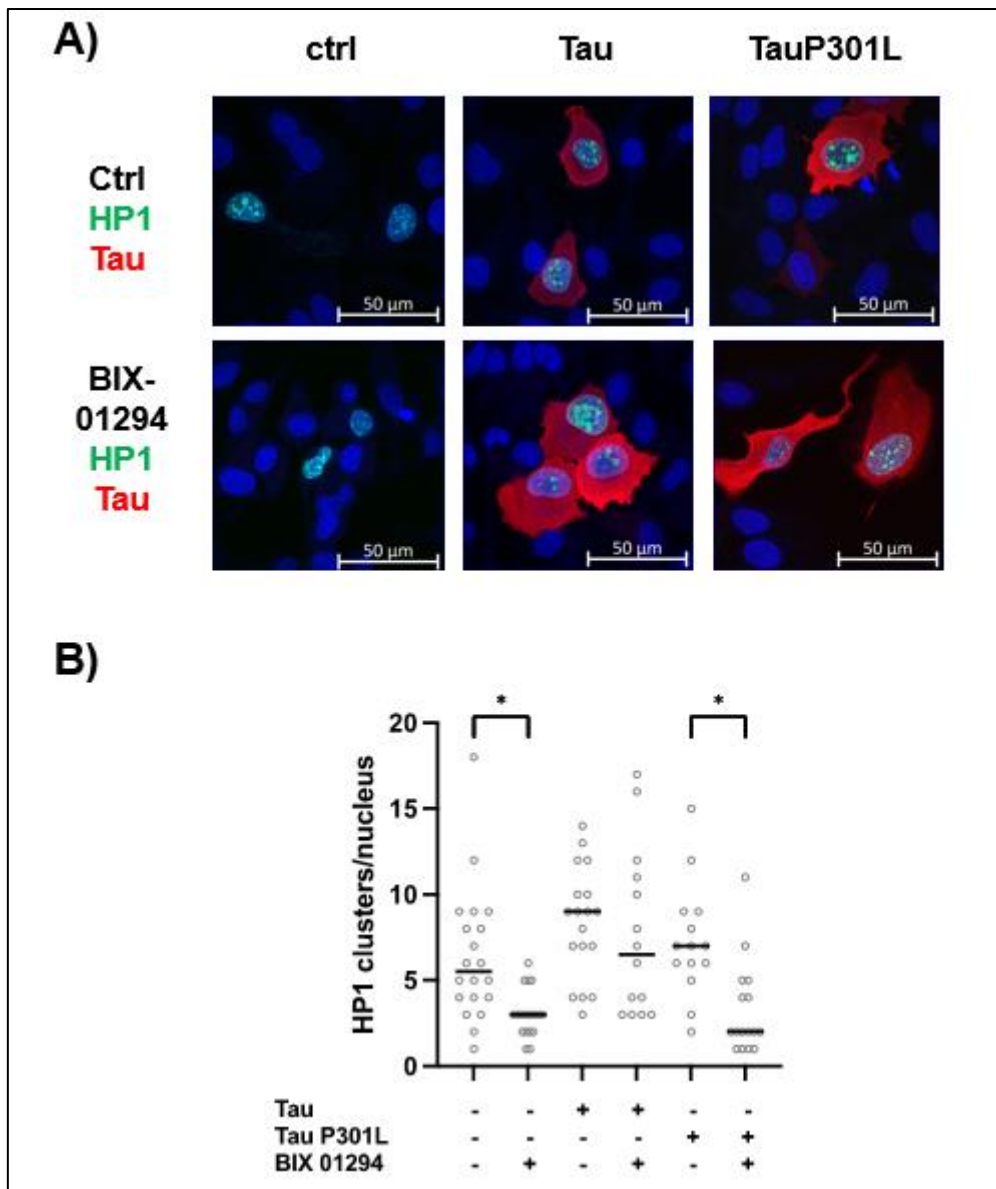


**Supplementary figure 5. Tau did not prevent H3 acetylation in vitro.** Purified GST-CBP (A) or nuclear extracts from HeLa cells (B) were incubated with histones, nucleosomes or tetraacetylated H4 nucleosome in the absence or presence of purified GST-Tau proteins. HAT assay was essentially performed as described previously (Tropberger, 2013).

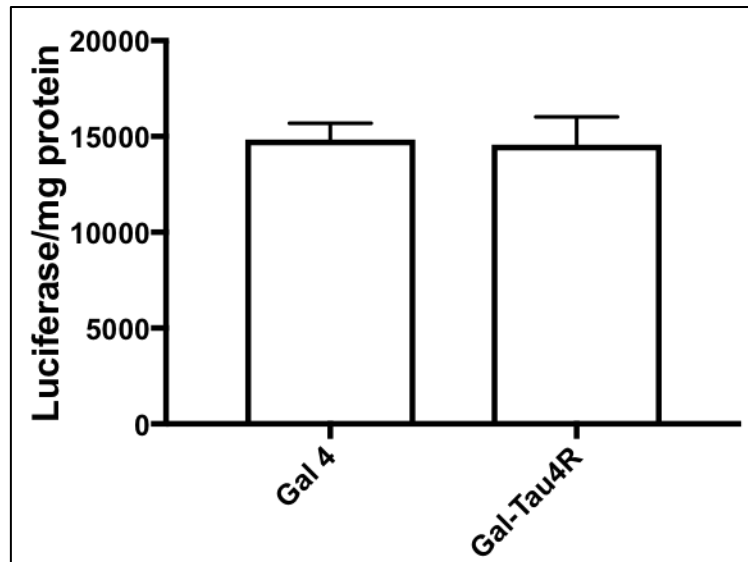




**Supplementary figure 6. Chromatin of Tau expressing cells is less accessible to MNase after TSA treatment.** Chromatin from control SH-SY5Y Tet-on cells (A, B, C) or TSA treated (300 nM, 24h) (D, E, F) with Tau expression induced or not by tetracycline (Tet), 24h before TSA treatment, were analyzed at different time points. Densitometric analysis, calculated on three independent experiments, revealed substantially decreased intensity of the 2N, 3N and 4N fragments in Tau expressing cells after TSA treatment indicating a less accessible chromatin. Data are mean±sd \*P<0.05, \*\*P<0.01.



**Supplementary figure 7. Effect of Tau4R or TauP301L on PCH structure under BIX 01294 treatment.** (A) Single confocal sections of HeLa cells transfected with GFP-HP1b, with or without Tau4R and treated 24h later BIX 01294 (6mM) for 24h. Tau C-ter antibodies and GFP fluorescence were used to visualize total Tau protein and HP1b respectively. Representative images are shown. (B) Quantification GFP-HP1b clusters per nucleus in HeLa cells transfected with GFP-HP1b, with or without Tau4R or Tau4R P301L and treated 24h later BIX 01294 (6mM) for 24h. Tau C-ter antibodies and GFP fluorescence were used to visualize total Tau protein and HP1b respectively. Data are mean±sd. \*P<0.05.



**Supplementary figure 8. Absence of ectopic tethered Tau4R effects of on integrated reporter plasmid displaying high basal luciferase activity.** Tau tethering did not prevent adjacent integrated reporter plasmid activity when displaying high basal luciferase activity. pGL4.31[luc2P/GAL4 UAS/Hygro] reporter gene was stably transfected in Hela cells and selected for high basal luciferase activity. Stable clone was then transfected with Gal4DBD (Gal4) or Gal4DBD-Tau4R. The luciferase activity was determined as described in the Materials and Methods. Data are mean±s.e.m.

Oligonucleotides	K <sub>D</sub> (μM)
Seq 1 : ACATGTGGCCACAAATTGTTATCCGGTCACAATTGGACAT	2.09 ± 0.44
Seq 2 : CCTTCTCTTTATCATTCTCTCCCTCCTTCTTTCCCTCTCT	1.23 ± 0.4
Seq 3 : GAGGGAGAGAGAGGAAGACAGAGGAAGAGGGAGGTGGAAG	0.8 ± 0.1
Seq 4 : ACAGGTGCAGAGGAAGATCTGGAGAGTGAGAGTGAGGCAG	2.16 ± 0.7
Seq 5 : CTCACCTTTCCCATTTCCACTCAGAACCCACTCCCCATCT	0.87 ± 0.23

**Supplementary table 1. Interaction between Tau4R and different oligonucleotides assessed by microscale thermophoresis.** Oligonucleotide 1 (seq 1) was used as a control compared to different GAGA responsive elements .MST was conducted using a NT.115 Pico MST instrument (Nano Temper Technologies GmbH) equipped with red and blue filter sets. His-Tau protein, diluted to 200 nM in PBS-T buffer (supplied by vendor), was labeled with Monolith His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA (Nano Temper). The RED-tris-NTA dye was diluted in PBS-T to 100 nM. The mix was incubated at room temperature in the dark for 30 min.

Oligonucleotides (50μM) were diluted with a serial 1:1 ratio of 16 gradients. Then the labeled protein and oligonucleotides were mix with 1:1 ratio and incubated at room temperature in the dark for 120 min. Capillaries are then filled individually and loaded into instrument. Data were acquired using high MST power and 100 % LED. Data were analyzed using MO Control Software (Nano Temper).

**Étude 3** : effet de la protéine tau dans la régulation du stress oxydant et implications dans la résistance thérapeutique à différents traitements

1. Introduction

Les cellules cancéreuses montrent des niveaux de stress oxydant plus importants que les cellules saines. Celui-ci provient notamment de perturbations du métabolisme cellulaire et d'altérations mitochondriales, favorables à la production d'EROs. Dans la cellule cancéreuse, le stress oxydant génère une instabilité génomique qui contribue au caractère agressif de la tumeur mais peut également mener à la mort cellulaire. Cette dualité est aujourd'hui exploitée par différentes thérapies qui visent à augmenter le stress oxydant dans l'ensemble des cellules. Le seuil de mort cellulaire sera ainsi atteint plus rapidement pour les cellules tumorales (Trachootham, Alexandre and Huang, 2009). Des mécanismes de résistance peuvent cependant exister grâce à des mécanismes de détoxification ou des modifications mitochondriales pouvant ainsi limiter ce stress oxydant.

Dans les neurones, le stress oxydant est une des causes majeures de la dégénérescence neuronale. Bien que les mécanismes menant à ce stress restent mal définis, des dysfonctions mitochondriales ont été rapportées. Celles-ci concernent leur morphologie, leur localisation ou encore leurs chaînes OXPHOS. Bien qu'il ait été démontré que le stress oxydant pouvait induire la pathologie tau, la perte-de-fonction de tau retrouvée dans les tauopathies semble également responsable de ces altérations (Cabezas-Opazo *et al.*, 2015).

Cette étude a permis de montrer que la protéine tau pouvait diminuer significativement les niveaux de stress oxydant par des mécanismes pouvant impliquer la modification de la morphologie et de la localisation des mitochondries. La conséquence de cette régulation serait alors une résistance des cellules cancéreuses exprimant *MAPT* à l'ensemble des thérapies induisant un stress oxydant.

2. Matériel et méthodes

a. Culture cellulaire, transfections et traitements

Les cellules des lignées cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231, du col de l'utérus HeLa et de neuroblastome humain SH-SY5Y ont été obtenues par le fournisseur ATCC et sont cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) supplémenté de pénicilline (100U/ml), streptomycine (100 g/ml), sérum de veau fœtal (10%) et AA non-essentiels (1%). Les cellules de la lignée HCC1954 obtenue chez ATCC sont cultivées dans du milieu RPMI1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*, Gibco) supplémenté de pénicilline (100U/ml), streptomycine (100 g/ml) et sérum de veau fœtal (10%).

Les plasmides GFP (Addgene, #13031), Tau-GFP (Addgene, #46908), mito-tracker DsRed (DsRed2-Mito-7, Addgene, #55838), GFP-ox total (pEGFP-N1-ro1GFP, Addgene, #82369, GFP-ox cytosolique (pMF1707, Addgene, #125584) et GFP-ox mitochondrial (pMF1762, Addgene, #125583) sont transfectées par lipofectamine (Lipofectamine 3000 Reagent, Invitrogen) comme agent de transfection lorsque les cellules atteignent environ 80% de confluence et selon le même protocole de transfection transitoire décrit dans l'étude 1. Aux termes de 48 heures de transfection, les cellules sont traitées. L'induction de stress oxydant est obtenue par addition de Ménadione Bisulfite (Sigma, #M5750) à une concentration finale de 125  $\mu$ M dans les MCF7, MDA-MB-231 et HCC1954 et 250  $\mu$ M dans les HeLa et par addition d'hydroperoxyde de tert-butyle (tBHP, « *tert-butylhydroperoxide* ») (Acros Organic, #10266090) à une concentration finale de 1,8 mM pendant 2 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### b. Western blot

Les échantillons protéiques de la lignée MCF7 sont analysés grâce à l'anticorps Drp1 (Cell Signaling, D6C7, #8570, dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du lait-TNT 5%) selon le protocole de western blot décrit dans l'étude 1.

#### c. Immunocytochimie, analyse des mitochondries et du RE

Les cellules fixées des lignées MCF7, HeLa et HCC1954 sont analysées selon le protocole d'immunocytochimie décrit dans l'étude 1 et grâce aux fluorescences générées par la transfection des plasmides codant la séquence du mito-tracker DsRed, roGFP-total, roGFP-cyto, roGFP-mito, de la GFP et de la Tau-GFP. La fluorescence du RE est obtenue par traitement des cellules avec le ER-tracker

Green (Thermofisher, BODIPY™ FL Glibenclamide, #E34251). La détection de Drp1 dans les MCF7 est réalisée grâce à l'anticorps Drp1 (Cell Signaling, D6C7, #8570, dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans de la BSA-PBS 2%). Les images sont obtenues par microscopie confocale (Spinning Disk).

#### d. Cytométrie de flux

Le stress oxydant est détecté par un fluorophore sensible à l'oxydation cellulaire (CellROX, DeepRed reagent, Thermofisher, #C10422) à une concentration finale de 2 µM et incubé 30 min à 37°C dans le milieu de culture. Les cellules sont ensuite décollées par trypsine et la fluorescence du rouge lointain est analysée par cytométrie de flux (LSR FORTESSA X20, analyseur BD).

#### e. Analyses statistiques

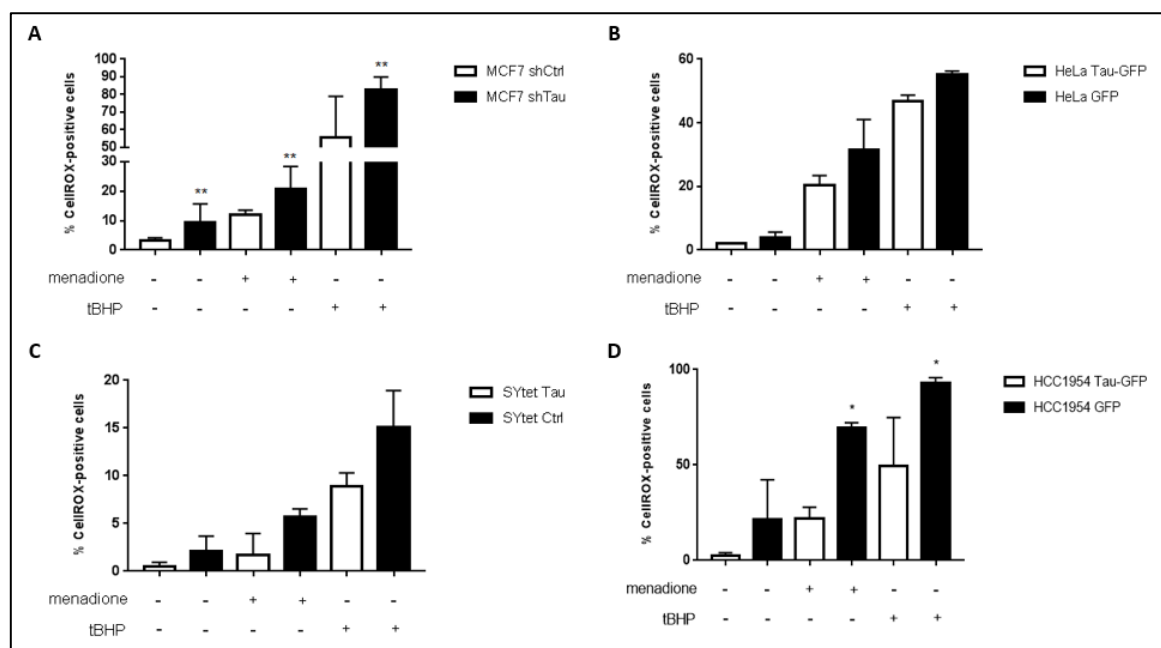
Les analyses statistiques des expériences de cette étude sont exprimées sous la forme de la moyenne des valeurs de chaque groupe testé et de l'erreur-type de cette moyenne. Ce travail a donné lieu à l'utilisation de trois différents tests : le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, l'ANOVA univarié et le test de Kruskal-Wallis. Les statistiques ont été obtenues grâce au logiciel GraphPad Prism.

### 3. Résultats

#### a. L'expression de MAPT est corrélée à une diminution du stress oxydant

Dans les neurones, il est suggéré que tau puisse jouer un rôle protecteur face au stress oxydant (David *et al.*, 2005; Sultan *et al.*, 2011; Cheng and Bai, 2018b). Nous avons donc émis l'hypothèse que cette fonction pouvait être étendue dans des cellules cancéreuses. Nous avons donc utilisé les clones MCF7 shCtrl vs shTau et MDA-MB-231 shCtrl vs shTau. Afin d'étendre ces résultats à d'autres lignées nous avons également utilisé des HeLa transfectées avec un plasmide codant la GFP ou une protéine de fusion Tau-GFP ainsi qu'une lignée SH-SY5Y transfectées stablement avec un système inductible tetON tau. Ces cellules ont été traitées avec deux molécules inductrices de stress oxydant : la ménadione bisulfite induisant un stress oxydant d'origine mitochondriale ainsi que le tBHP induisant un stress oxydant général.

La détection du stress oxydant a été réalisée grâce à une molécule fluorescente intracellulaire active en présence d'un environnement intracellulaire oxydant. L'analyse des cellules en cytométrie de flux a montré, dans un premier temps, qu'un stress oxydant basal est détecté dans 10,6% de cellules MCF7 shTau contre 3,1% dans les MCF7 shCtrl. De plus, le traitement à la ménadione induit un stress oxydant dans 16,9% et 11,8% des MCF7 shTau et shCtrl, respectivement. Le traitement tBHP est responsable d'un stress oxydant dans 78,7% et 70,6% des MCF7 shTau et shCtrl, respectivement (figure 1A). Des résultats similaires sont obtenus dans d'autres lignées. Ainsi, en conditions basales, nous détectons un stress oxydant dans 3,9% de HeLa GFP contre 2% de HeLa Tau-GFP ; sous le traitement à la ménadione nous obtenons 31,6% de HeLa GFP contre 20,3% de HeLa Tau-GFP sujettes à un stress et sous le traitement au tBHP nous avons 55,2% de HeLa GFP contre 46,7% de HeLa Tau-GFP présentant un stress oxydant (figure 1B).



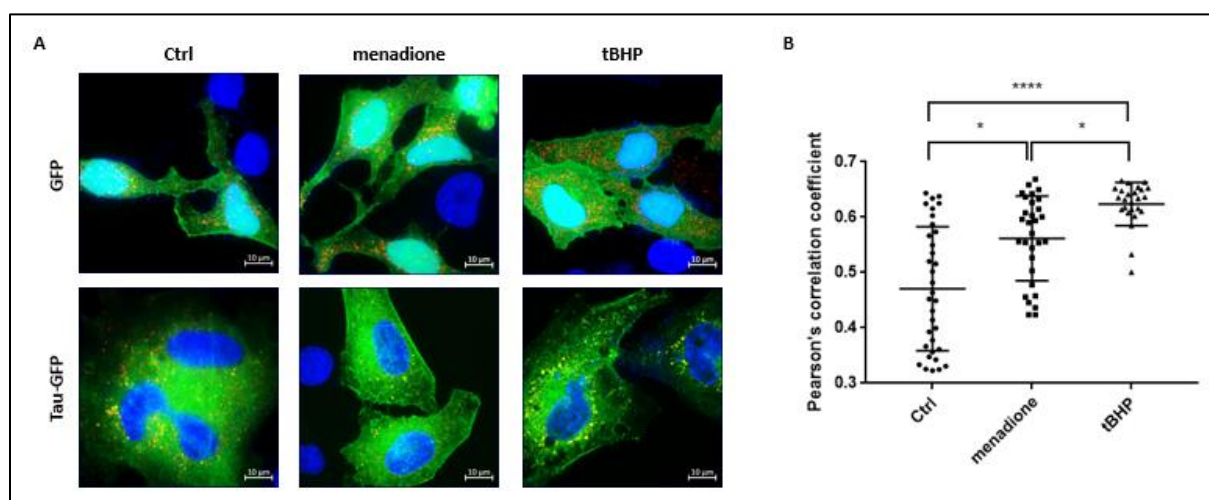
**Figure 1. Effet de tau sur le stress oxydant.** Le pourcentage de cellules sujettes stress oxydant a été mesuré grâce au CellROX dans les MCF7 shCtrl vs shTau (A), HeLa Tau-GFP vs GFP (B), SH-SY5Y Tau vs Ctrl (C) et HCC1954 Tau-GFP vs GFP (D). Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SD du % de cellules positives de 3 expériences indépendantes. Test statistique : Mann-Whitney.

Pour les SH-SY5Y, nous observons des différences de pourcentages de cellules présentant un stress oxydant similaires en conditions contrôles (2% de SH-SY5Y ctrl vs. 0,5% de SH-SY5Y tau), sous le traitement à la ménadione (5,7% de SH-SY5Y ctrl vs. 1,7% de SH-SY5Y tau) et sous le traitement au

tBHP (15,1% de SH-SY5Y ctrl vs. 8,9% de SH-SY5Y tau) (figure 1C). Enfin, pour les HCC1954, nous observons également des différences en conditions contrôle (21,4% de HCC1954 GFP vs. 2,3% de HCC1954 Tau-GFP), sous le traitement à la ménadione (69,3% de HCC1954 GFP vs. 22,2% de HCC1954 Tau-GFP) et sous le traitement au tBHP (93% de HCC1954 GFP vs. 49,6% de HCC1954 Tau-GFP) (figure 1D). En conclusion, un stress oxydant est généré avec un pourcentage plus faible de cellules lorsque tau est exprimée. Cette protection est valable pour un stress oxydant général ou d'origine mitochondriale.

b. Le stress induit augmente l'enrichissement de tau au niveau mitochondrial

Le principal lieu de production d'EROs est la mitochondrie. Aux vues des études publiées montrant que la protéine tau pouvait être retrouvée au niveau mitochondrial, nous avons cherché à déterminer si celle-ci était également retrouvée à la mitochondrie dans nos modèles et si cette localisation était modulée par l'induction de stress.



**Figure 2. Colocalisation entre tau et la mitochondrie.** (A) Les cellules HeLa cotransfectées avec un plasmide codant la GFP ou la Tau-GFP et un plasmide codant le traceur de la mitochondrie mito-tracker DsRed. Les cellules sont ensuite traitées avec la ménadione ou le tBHP puis fixées et analysées par microscopie confocale. (B) La colocalisation entre la Tau-GFP et la mitochondrie est évaluée grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Les résultats sont exprimés par l'ensemble des points de colocalisation. Test statistique : Kruskal-Wallis.

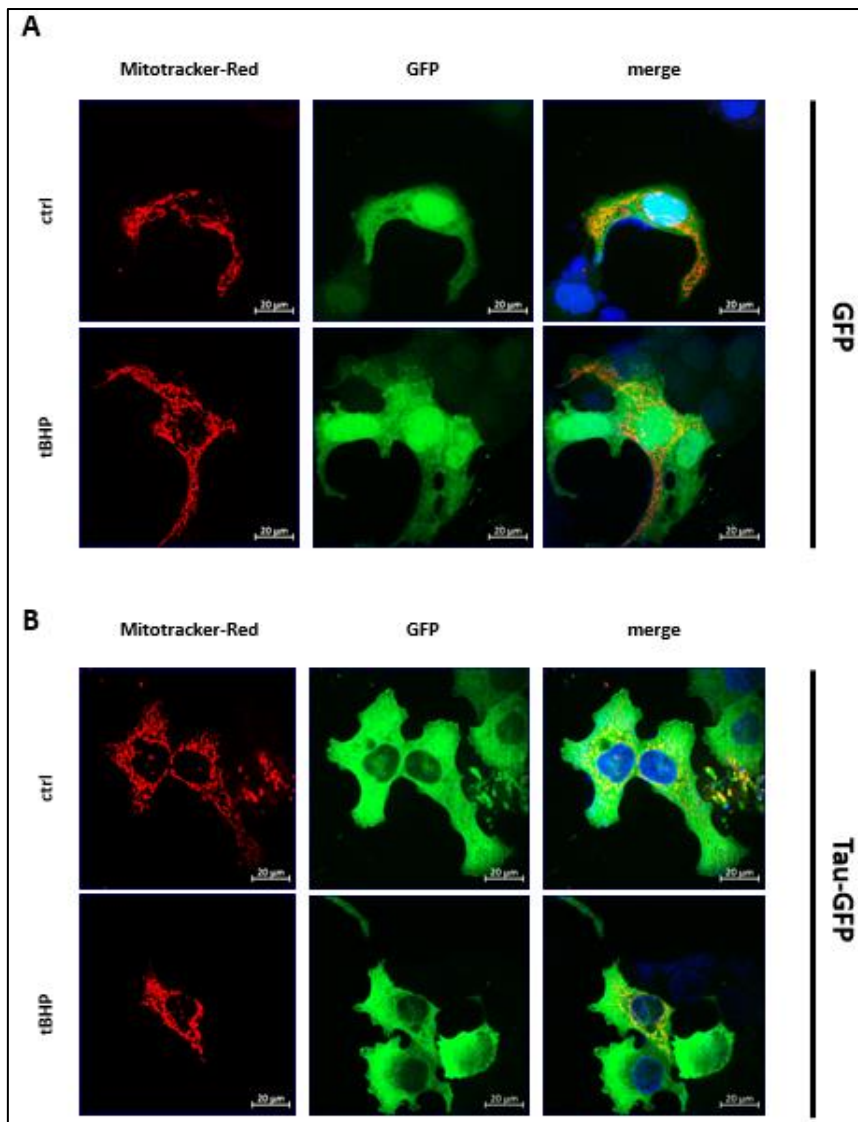


Pour cela, nous avons donc réalisé des immunocytochimies sur des cellules HeLa transfectées avec un plasmide codant la GFP (HeLa GFP) ou un plasmide possédant la séquence codante de tau 1N4R fusionnée à celle de la GFP (HeLa Tau-GFP) en complément d'un plasmide codant la DsRed avec une séquence d'adresse à la mitochondrie (mito-tracker DsRed). Ces cellules ont ensuite été traitées avec de la ménadione bisulfite ou du tBHP selon les paramètres utilisés et décrits précédemment. Les analyses des cellules fixées au microscope confocal confirment une colocalisation entre la protéine tau et la mitochondrie en condition basale et conditions traitées (figure 2A). En réalisant une analyse de la colocalisation par le coefficient de corrélation de Pearson, nous avons remarqué que la colocalisation entre tau et la mitochondrie augmentait de 1,2 fois avec le traitement à la ménadione et de 1,3 fois avec le traitement tBHP (figure 2B). Ces données indiquent qu'il y a un enrichissement de protéines tau à la mitochondrie en réponse à un stress oxydant induit.

#### c. La localisation des mitochondries est modifiée par tau

Les travaux réalisés sur les tauopathies montrent un regroupement périnucléaire des mitochondries en présence de tau qui est associé à la dégénérescence neuronale (Stamer *et al.*, 2002; DuBoff, Götz and Feany, 2012; Hu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Cieri *et al.*, 2018). Toutefois, cette localisation spécifiques des mitochondries dans des cellules cancéreuses ont pu être associé à des mécanismes d'agressivité tumorale comme la résistance à l'hypoxie et l'angiogenèse (Al-Mehdi *et al.*, 2012).

Nous avons alors cherché à déterminer si des différences de localisation des mitochondries pouvaient être retrouvées en présence de tau. Nous avons donc réalisé une immunocytochimie de cellules HCC1954 infectées avec un plasmide codant la GFP ou la séquence d'une protéine de fusion Tau-GFP. Les deux clones HCC1954 ont été transfectés transitoirement avec un plasmide codant la DsRed avec une séquence signale d'adresse à la mitochondrie (mito-tracker DsRed) et traitées ou non avec le tBHP (figure 4).

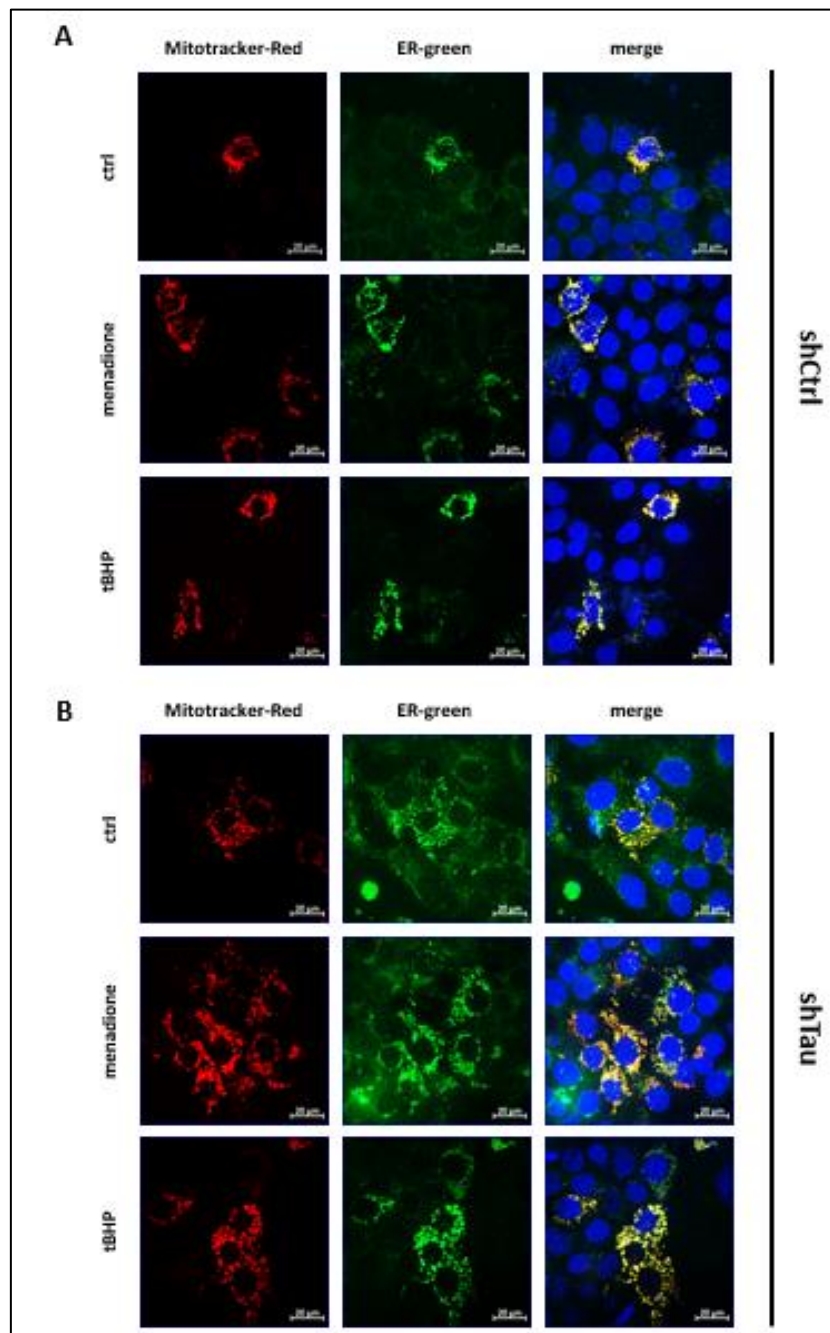


**Figure 3. Localisation des mitochondries dans les HCC1954 GFP et Tau-GFP.** Les HCC1954 infectées avec des plasmides codant la GFP ou la Tau-GFP sont transfectées avec le plasmide mito-tracker DsRed puis traitées avec le tBHP. Les cellules (A) HCC1954 GFP et (B) HCC1954 Tau-GFP sont analysées par microscopie confocale.

L'analyse des cellules par microscopie confocale montre que la distribution des mitochondries est diffuse entre le noyau et la périphérie dans les HCC1954 GFP (figure 3A) alors qu'elle est regroupée dans la zone périnucléaire dans les HCC1954 Tau-GFP en condition basale (figure 3B). L'induction d'un stress oxydant par le tBHP renforce cette localisation périnucléaire dans les HCC1954 Tau-GFP mais pas dans les HCC1954 GFP (figure 3).

d. L'interaction mitochondrie-RE n'est pas altéré

Des travaux réalisés sur des cellules HeLa et de mélanome A375 ont montré que des défauts de localisation des mitochondries pouvaient résulter de défauts d'interaction avec le réticulum endoplasmique (RE) et générer un stress oxydant (Corazao-Rozas *et al.*, 2016; Cieri *et al.*, 2018; Marchi *et al.*, 2018).



**Figure 4. Interactions entre RE et mitochondrie dans les MCF7 shCtrl et shTau.** Les MCF7 shCtrl et shTau sont transfectées avec le plasmide mito-tracker DsRed puis traitées avec le RE-tracker Green. Les cellules sont

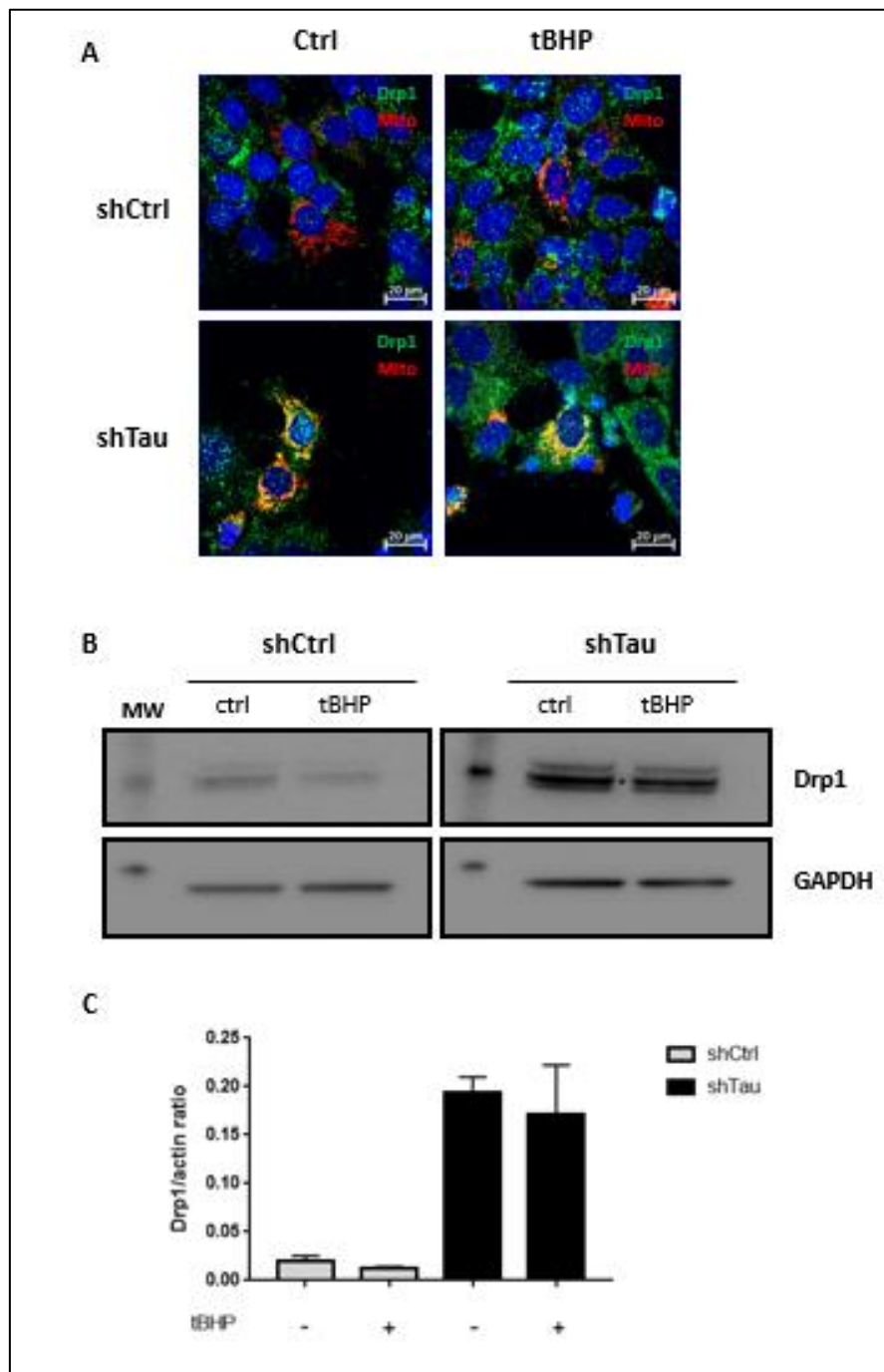
ensuite traitées à la ménadione ou avec le tBHP. Les cellules (A) MCF7 shCtrl et (B) MCF7 shTau sont analysées par microscopie confocale.

Nous avons donc étudié l'interaction mitochondrie-RE dans les clones MCF7 shCtrl et shTau avec les mêmes conditions que les expériences précédentes. Pour cela, nous avons transfecté ces cellules avec le plasmide mito-tracker DsRed puis traité avec une molécule dirigée au RE (*RE-tracker*) avec ou sans traitement à la ménadione et au tBHP. Dans les MCF7, nous retrouvons une localisation périnucléaire des mitochondries dans les clones shCtrl (figure 4A) alors que celles-ci sont diffuses dans la cellule dans les clones shTau (figure 4B) ce qui confirme les résultats obtenus dans les clones HCC1954 (figure 4). De manière intéressante, le RE est également retrouvé dans la région périnucléaire dans les shCtrl alors qu'il est diffus dans la cellule dans les shTau. Nous retrouvons en effet une colocalisation entre les deux organites dans toutes les conditions montrant que l'interaction mitochondrie-RE n'est pas altérée en présence de tau (figure 4).

e. Le niveau de Drp1 est réduit dans les cellules tau-positives

Selon l'étude réalisée par DuBoff et son équipe, la protéine tau dans les neurones semble intervenir dans un processus de délocalisation de la protéine Drp1 de la mitochondrie, limitant alors le processus de fission (DuBoff, Götz and Feany, 2012). Nous avons donc cherché à déterminer si cet évènement avait également lieu dans les cellules cancéreuses. Par une approche d'immunofluorescence, nous avons étudié la présence de Drp1 autour de la mitochondrie dans les clones MCF7 transfectés avec le plasmide mito-tracker DsRed (figure 5A).

Nos résultats montrent une colocalisation entre la mitochondrie et Drp1 dans les shTau en conditions basales et tBHP mais pas dans les shCtrl. De manière surprenante, Drp1 n'est pas délocalisée de la mitochondrie mais semble absente des cellules shCtrl (figure 5A). Nous avons alors déterminé la quantité de Drp1 dans les MCF7 shCtrl et shTau traitées ou non au tBHP par western blot (figure 5B). La quantification nous a permis de conclure que dans les MCF7 shCtrl il y a 9,8 fois moins de Drp1 en conditions basales et 13,5 fois moins en condition traitée que dans les MCF7 shTau (figure 5C). Les résultats indiquent que le niveau de Drp1 est diminué en présence de tau. De plus, l'induction d'un stress oxydant génère une baisse de Drp1 d'environ 35,5% et 11,3% dans les shCtrl et shTau, respectivement.



**Figure 5. La protéine Drp1 est absente dans les cellules tau-positives.** (A) Les MCF7 shCtrl et shTau sont transfectées avec le plasmide mito-tracker DsRed puis traitées avec le tBHP. La présence de Drp1 est déterminée par un anticorps Drp1 et révélée par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome émettant dans le vert (488 nm). Les images sont analysées par microscopie confocale. (B) La présence de Drp1 est déterminée par l'anticorps anti-Drp1 par western blot. (C) La quantification représente le ratio moyen entre la quantité de Drp1 sur la quantité de GAPDH de deux expériences indépendantes.

#### 4. Discussion

Dans ce travail exploratoire, nous avons établi un effet de tau dans la régulation du stress oxydant basal et induit par des traitements de ménadione et de tBHP. Nous avons trouvé que l'induction de stress oxydant entraîne une relocalisation de protéines tau à la mitochondrie. Au niveau de cet organite, nous avons mis en évidence que l'expression de tau est associée à une localisation périnucléaire des mitochondries est que celles-ci sont dépourvues de protéine Drp1 que l'on sait être impliquée dans le processus de fission (Frank *et al.*, 2001).

Cette fonction de tau dans la diminution du stress oxydant basal et induit pourrait s'avérer importante dans la résistance face aux thérapies induisant ce type de stress. En effet, la majorité des chimiothérapies et la radiothérapie induisent, en plus de leurs mécanismes principaux, un stress oxydant (Davies and Doroshov, 1986; Leach *et al.*, 2001; McCormick *et al.*, 2016). La stratégie thérapeutique qui consiste à exploiter le stress oxydant intrinsèquement élevé dans les cancers s'avérerait donc inefficace en présence de tau (Trachootham, Alexandre and Huang, 2009).

Dans la littérature, les différences de stress oxydant entre des cellules tau-positives et tau-négative peut trouver plusieurs explications. Cieri et al ont rapporté des défauts d'interactions entre la mitochondrie et le RE en présence d'une protéine tau pathologique (tau tronquée). Ces modifications des contacts entre les deux organites entraînaient des perturbations dans les flux calciques, déstabilisaient ainsi le métabolisme cellulaire et favorisait l'apoptose (Cieri et al., 2018). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'absence de tau dans les MCF7 pouvait être associée à des altérations similaires. Cependant, nos résultats montrent une colocalisation entre la mitochondrie et le RE indépendamment de l'expression de tau et d'un stress induit. Un autre mécanisme régulant dans la localisation mitochondriale implique leur transport microtubulaire et nécessitant l'intervention des protéines motiles kinésine et dynéine ainsi que des protéines adaptatrices telles que TRAK1/2 et Miro1/2 (Melkov and Abdu, 2018). Dans les neurones d'hippocampe de souris et de rats, il a été montré que la perte de Miro1 était associée à une réduction du transport rétrograde des mitochondries (Macaskill *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2014). De manière intéressante, il a été montré que HDAC6 pouvait déacétyler Miro1 et altérer le mouvement des mitochondries provoquant la mort cellulaire (Chen *et al.*, 2010; Kalinski *et al.*, 2019). Dans les neurones, l'histone déacétylase HDAC6 est donc associée à des dérégulations du transport des mitochondries. Dans une étude, Perez et al ont mis en évidence que la protéine tau pouvait lier HDAC6 et réduire son activité résultant en une augmentation de l'acétylation des microtubules et de ses protéines motiles

(Perez *et al.*, 2009). Les modifications de localisation des mitochondries entre les différentes lignées cellulaires tau-positives et tau-négatives dans notre étude peuvent donc dépendre d'un mécanisme impliquant Miro1 et HDAC6. Toutefois, le lien entre la localisation périnucléaire des mitochondries et la régulation du stress oxydant n'est pas clair. Dans la majorité des études réalisées sur les tauopathies, leur accumulation autour du noyau résulte en un appauvrissement des axones en mitochondries et est associée à la mort neuronale (Stamer *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2016). Toutefois, une équipe a montré que la proximité entre la mitochondrie et le noyau pouvait servir de signalisation entre les deux compartiments. Dans des cultures primaires de cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines (HPAEC, *Primary Human Pulmonary Artery Endothelial Cells*), les auteurs ont démontré que ce regroupement périnucléaire mitochondrial pouvait être retrouvé en condition d'hypoxie. Cette localisation précise génère des EROs en tant que seconds messagers pouvant aller dans le noyau et apporter des modifications sur des séquences promotrices. Parmi elles, l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE, *Hypoxia Response Element*) modifié par ces EROs étant plus enclin à fixer le facteur d'hypoxie 1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) et induire l'expression de certains gènes comme le *VEGF*. La suppression de cette dynamique mitochondriale par le nocodazole ou par un siRNA dirigé contre la dynéine inhibe la totalité de ce mécanisme (Al-Mehdi *et al.*, 2012). L'oxydation de séquences du génome peut donc avoir un rôle transcriptionnel. Perillo et collègues ont montré par exemple qu'une oxydation de l'ADN pouvait permettre une expression génique par les œstrogènes (Perillo *et al.*, 2008). De la même façon, une communication étroite entre la mitochondrie et le noyau a été établie dans la réponse à différents évènements cellulaires tels que le stress oxydant (Eisenberg-Bord and Schuldiner, 2017). Ainsi, la proximité des mitochondries avec le noyau en présence de tau pourrait permettre un signal d'activation de la transcription de certains gènes, notamment impliqués dans la détoxification cellulaire.

En plus de la localisation, la morphologie mitochondriale est impactée par tau. Dans un modèle transgénique de *Drosophila* possédant une tau humaine, DuBoff et collaborateurs ont montré que Drp1 était délocalisée de la mitochondrie menant à une diminution de la fission (DuBoff, Götz and Feany, 2012). Dans notre étude, bien que nous n'observions pas de délocalisation de Drp1, nous avons trouvé que celle-ci était fortement diminuée dans les MCF7 shCtrl en comparaison avec les MCF7 shTau (figure 6). De manière intéressante, en réponse au stress, les MCF7 shCtrl affichent une baisse de Drp1 beaucoup plus importante que dans les shTau. Cet effet de tau semble protecteur face aux thérapies induisant un stress oxydant. En effet, en réponse à un stress oxydant modéré, l'activation de la fission sert de « contrôle qualité » permettant l'élimination de mitochondries endommagées. Cependant, un

stress trop important génère un excès de fission qui mène à un stress oxydant et à la mort cellulaire (Wu *et al.*, 2011). Ainsi, la diminution de Drp1 dans les MCF7 shCtrl peut constituer une protection de la cellule face à un excès de fission induite par des traitements. En plus de Drp1, d'autres protéines sont impliquées dans les cycles de fusion/fission telles que Fis1 pour la fission et Opa1, Mfn1 et Mfn2 pour la fusion. En 2016, Li et al ont démontré que de fortes expression de tau dans des cellules HEK293 ainsi que dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe mènent à une augmentation de la fusion mitochondriale (Li *et al.*, 2016). Ainsi, la protéine tau semble être favorable à la fusion et défavorable à la fission. Dans un contexte thérapeutique, un tel effet rendrait alors inefficace les thérapies inductrices de stress oxydant.

Bien que ces résultats restent incomplets, ils suggèrent néanmoins que la protéine tau est impliquée dans la régulation du stress oxydant des cellules cancéreuses. Celle-ci, en diminuant la quantité de Drp1, devrait limiter l'excès de fission entraîné par un stress oxydant sévère et ainsi empêcher l'induction de l'apoptose. Les autres effets de tau concernant la localisation des mitochondries dans la région périnucléaire ne sont pas encore clairs. Toutefois, ces résultats indiquent que la protéine tau peut être un facteur de résistance aux thérapies induisant un stress oxydant.



# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

Ce travail de thèse a permis d'établir de nouveaux rôles pour la protéine tau dans les cancers. En cumulant les données bibliographiques sur un effet de tau sur la stabilité génomique (Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2014, 2015; Bou Samra *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2018) et le maintien de l'hétérochromatine constitutive (Frost, Hemberg, Lewis and Mel B. Feany, 2014; Mansuroglu *et al.*, 2016b; Gargini, Segura-Collar and Sánchez-Gómez, 2019), nous avons construit notre hypothèse de travail : **ces fonctions de la protéine tau établies dans les cellules neuronales peuvent constituer des mécanismes de résistances aux thérapies induisant des dommages à l'ADN, un remodelage de la chromatine ou une oxydation cellulaire dans les cellules cancéreuses**. Nous avons ainsi trouvé que :

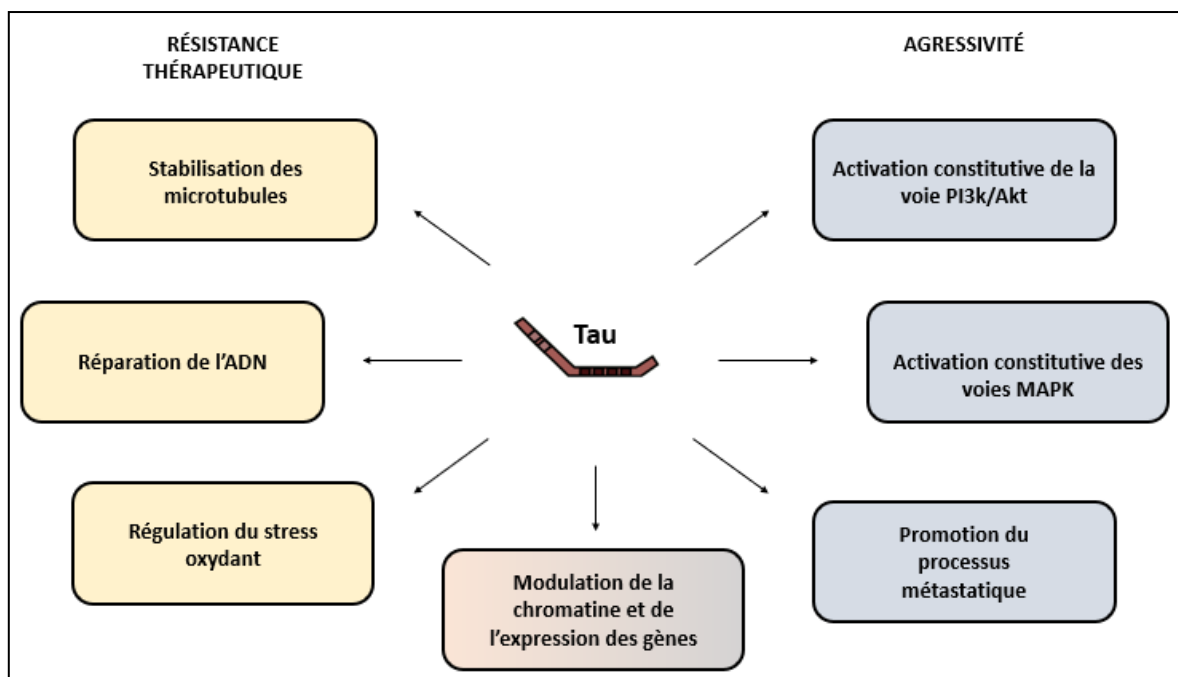
1. La protéine tau améliore les activités de réparation de l'ADN NHEJ et HR. Cette amélioration de l'activité NHEJ est expliquée par un transport microtubulaire de 53BP1 vers le centrosome, favorisant sa translocation nucléaire. Cette fonction induit alors une résistance à certaines chimiothérapies et à la radiothérapie *in vitro* et *in vivo*.
2. La protéine tau maintient l'organisation de l'hétérochromatine en présence d'un HDACi, la TSA, en fixant spécifiquement les histones H3 et H4 non modifiés ou l'histone H4 acétylée. Cette fonction limite le remodelage de l'hétérochromatine et la réexpression de gènes du cycle cellulaire et de l'apoptose et induit une résistance à la TSA.
3. La protéine tau régule négativement l'apparition d'un stress oxydant et contrôle la localisation et la morphologie mitochondriale par un mécanisme dépendant de Drp1. Bien que les mécanismes sous-jacents cette fonction ne soient pas totalement élucidés, elle pourrait constituer un mécanisme de résistance à plusieurs thérapies induisant un stress oxydant.

En se basant sur la littérature traitant du rôle de tau dans la protection génomique (Hua and He, 2003; Wei *et al.*, 2008b; Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2014), nous avons cherché à déterminer dans un premier temps la nature de cette protection. En raison des observations faites par plusieurs équipes montrant un effet de tau dans la résistance aux MTA, nous avons choisi de vérifier si cette fonction de tau dans le maintien de l'intégrité du génome pouvait être associée à une résistance aux DDA dans les cancers. Nos résultats ont permis de montrer que tau pouvait constituer un facteur de résistance à des chimiothérapies à base d'inhibiteurs de topoisomérase II (doxorubicine), de radiomimétiques

(bléomycine) et d'agents alkylants (cisplatine et oxaliplatine) ainsi qu'à la radiothérapie (rayons X). Afin de déterminer si la seule et unique présence de tau était suffisante pour induire une résistance aux DDA, nous avons établi un clone shScramble (shCtrl) et un shRNA dirigé contre l'ARNm de *MAPT* (shTau) dans plusieurs lignées cellulaires. Le mécanisme que nous avons trouvé et qui est décrit dans ce travail s'explique ainsi : la protéine tau améliore le transport microtubulaire de la protéine 53BP1 vers le centrosome ce qui favorise sa translocation nucléaire. En réponse à une CDB, la présence nucléaire de 53BP1 permet d'initier l'activité de réparation de l'ADN et limiter les dommages induits. Toutefois, il est possible que d'autres mécanismes impliquant tau s'ajoutent à ce que nous décrivons. Parmi eux, le rôle de tau dans l'activation de la voie de signalisation PI3k/Akt (Marciniak *et al.*, 2017; Tai *et al.*, 2020) pourrait intervenir dans la modulation de la voie DDR. En effet, l'implication de cette voie dans l'activation de la réparation de l'ADN a été décrite (Toulany and Rodemann, 2013; Juvekar *et al.*, 2016). En complément de la fonction microtubulaire de tau dans la réparation de l'ADN, il est possible que l'inhibition de PTEN qu'elle initie, entraîne une activation constitutive des voies de réparation de l'ADN et participe ainsi à la résistance thérapeutique. Outre les fonctions cytosoliques de tau, sa présence dans le noyau soulève des questions quant à ses potentielles fonctions dans ce compartiment. Dans les études menées par le docteur Galas, il a été mis en évidence que l'induction d'un stress thermique (mimant un stress oxydant non toxique) avait pour conséquence une translocation nucléaire de la protéine tau (Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2014). Cependant, les mécanismes régulant cette translocation ne sont pour le moment pas connus. Dans une de ces études, l'infection de cellules avec un plasmide codant tau avec une séquence d'adressage nucléaire (tau-NLS) a permis de restaurer partiellement le niveau basal de dommages à l'ADN (Sultan *et al.*, 2011) supposant donc une fonction nucléaire de tau dans la réponse aux dommages induits. Dans cette dernière étude, la protéine tau est majoritairement retrouvée à l'état déphosphorylée dans le noyau à l'exception de la sérine 262 qui est phosphorylée (Sultan *et al.*, 2011). En effet, cet épitope semble être l'un des rares pouvant être phosphorylé dans ce compartiment en condition de stress (Shanavas and Papasozomenos, 2000). De manière intéressante, il a été montré que la sérine 262 de tau pouvait être phosphorylée par la protéine impliquée dans la voie DDR : Chk2 (Iijima-Ando *et al.*, 2010). Brièvement, la protéine Chk2, codée par le gène *CHEK2*, est une kinase impliquée dans la voie DDR qui inhibe des protéines du cycle cellulaire (phospho-Ser123 Cdc25A et phospho-Ser216 Cdc25C) et active des protéines de réparation de l'ADN comme BRCA1 (phospho-Ser988) (pour revue (Ahn, Urist and Prives, 2004)). Cette phosphorylation de tau sur la sérine 262 est expliquée par Iijima-Ando et son équipe par le fait que dans le cerveau âgé ou dans la

neurodégénérescence, l'augmentation du stress oxydant et l'accumulation de dommages à l'ADN mène à une suractivation de Chk2 qui va, de ce fait, augmenter la proportion de protéines tau phosphorylées sur la sérine 262. Cet épitope étant impliqué dans la physiopathologie d'Alzheimer (Augustinack *et al.*, 2002), ce mécanisme impliquant Chk2 conduirait à la pathologie tau (Iijima-Ando *et al.*, 2010). Toutefois, la phosphorylation de tau par Chk2 soulève deux questions intéressantes : d'abord, l'activation de Chk2 par l'induction de dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses conduit-elle également à la phosphorylation tau-ser262 dans le noyau ? Si oui, cette phosphorylation dans le noyau est-elle impliquée dans une fonction particulière, notamment dans les voies de réparation de l'ADN ? Un mutant tau non-phosphorylable Ser262Ala identique à celui utilisé dans le travail d'Iijima-Ando et al pourrait permettre de répondre à cette question dans des lignées de cellules cancéreuses. De plus, il est connu aujourd'hui que la protéine tau possède un nombre important de partenaires protéiques. Dans l'étude de l'interactome de tau, Gunawardana et al lui ont trouvé une interaction avec les protéines de la voie NHEJ Ku80 (XRCC5) et Ku70 (XRCC6) (Gunawardana *et al.*, 2015b). Bien que cette étude n'ait pas établi de potentielle fonction, il est possible que tau module la réparation de l'ADN à travers des interactions directes avec ces protéines. En plus du rôle direct de tau dans les mécanismes de réparation de l'ADN, nous pouvons poser l'hypothèse que d'autres voies soient suractivées parallèlement. Enfin, nous nous sommes concentrés dans cette étude principalement sur les activités de réparation de l'ADN de type HR et NHEJ. Ces systèmes de réparation sont particulièrement importants car ils permettent de limiter l'accumulation de CDB de l'ADN, le type de lésion les plus toxiques pour une cellule. En plus de la HR et NHEJ, il existe deux autres mécanismes de réparation des CDB : la réparation a-NHEJ et la SSA. À l'instar de la HR, la SSA nécessite une resection du brin 5' endommagé et d'une homologie de séquence, plus restreinte que dans la HR, pour réaliser la réparation. À l'inverse de la HR, ces deux mécanismes n'utilisent pas la complémentarité de la chromatide sœur après la phase de réplication et sont donc principalement représentés en début de phase S du cycle (Bhargava, Onyango and Stark, 2016). La a-NHEJ en revanche, effective tout au long du cycle comme la c-NHEJ, n'utilise pas nécessairement d'homologie de séquence. Nous n'avons pas étudié ici l'impact de la protéine tau sur ces deux voies. La réparation de type a-NHEJ a été associée à une forte instabilité génomique dans les cancers (pour revue (Caracciolo *et al.*, 2019)). Les résultats obtenus *in cellulo* et *in vivo* dans notre étude sont favorables à un effet de tau dans la maintenance du génome après traitement et éloigne donc l'hypothèse d'un effet également sur la a-NHEJ. Toutefois, aux vues de ses fonctions microtubulaires et nucléaires, nous ne pouvons exclure que tau puisse avoir un effet positif ou négatif sur ces autres

voies. En effet, certains travaux ont trouvé des activités de réparation a-NHEJ importantes dans certaines lignées cellulaires de cancers (Tobin *et al.*, 2012; Muvarak *et al.*, 2015; Newman *et al.*, 2015). Enfin, la protéine tau joue un rôle important dans le maintien et la stabilité de l'hétérochromatine (Frost, Hemberg, Lewis and Mel B. Feany, 2014; Mansuroglu *et al.*, 2016b; Rossi *et al.*, 2018). Notre étude confirme d'une part cet effet et le précise en montrant que tau a la capacité de lier les histones acétylées, notamment et en particulier H4K8K16ac. Bien que nous ayons montré que cette interaction spécifique participait au maintien de l'HPC et de la chromatine condensée malgré l'effet de la TSA, le rôle que joue tau sur ces modifications épigénétiques n'est pas entièrement élucidé. Cela est d'autant plus intéressant quand nous savons que la réparation d'une CDB de l'ADN nécessite une relocalisation de celle-ci à la périphérie du noyau et des remodelages de la chromatine important, impliquant l'histone H4 acétylée. Aux vues de son caractère pléiotrope, il est légitime de se demander si les fonctions de tau sur la chromatine peuvent être associées de près ou de loin à son effet sur la réparation de l'ADN.



**Figure 1. Implications de la protéine tau dans la résistance thérapeutique et l'agressivité des cancers.** La stabilisation des microtubules et la réparation de l'ADN constituent des résistances aux thérapies contenant des DDA et MTA, respectivement. La régulation du stress oxydant constitue un mécanisme de résistance à la majorité des chimiothérapies et à la radiothérapie. Tau peut être favorable à l'agressivité tumorale à travers la suractivation des voies de signalisation PI3k/Akt et MAPK mais également dans la formation et le développement des métastases. Enfin, le maintien de la chromatine à des endroits spécifiques du génome peut

entraîner une résistance aux HDACi mais peut également participer à l'agressivité tumorale à travers l'extinction de gènes clés.

Dans notre deuxième étude, nous mettons en évidence un rôle de tau dans la résistance aux HDACi. Son expression seule n'induit pas de modification de l'organisation de la chromatine mais empêche son remodelage par la TSA ainsi qu'à d'autres épdrogues. Nous expliquons ce maintien de l'hétérochromatine par une liaison de tau sur les histones H3 et H4 non modifiées ou sur l'histone H4 acétylée. Les résultats que nous avons obtenus n'ont pas montré d'interaction de tau avec la modification d'histone H3K9me2/3 suggérant donc un rôle indirect de tau dans le maintien de l'hétérochromatine en présence de TSA. Par ailleurs, il est décrit que les HDACi n'affectent que peu de gènes (entre 2% à 5% de gènes réexprimés par ces traitements) et que leur mécanisme de cytotoxicité est également lié à une déstabilisation de ces régions induisant une instabilité génomique (Van Lint, Emiliani and Verdin, 1996; Taddei *et al.*, 2001; Glaser *et al.*, 2003). La résistance à la TSA en présence de tau renforce alors nos résultats concernant son rôle dans la stabilité génomique. D'autre part, il est intéressant de noter que les inhibiteurs de HDAC ont des effets probants sur les tumeurs hématologiques mais pas sur les tumeurs solides. D'aucuns ont émis l'hypothèse que cette différence était due aux pharmacocinétiques très faibles de la plupart des inhibiteurs de HDAC ce qui ne permettait pas, dans ces dernières, d'atteindre des concentrations thérapeutiques (Choi *et al.*, 2012). Toutefois, d'autres explications peuvent être envisagées. Bien que des différences d'efficacité de traitement ne soient jamais dues qu'à un seul et unique facteur, la présence ou non de la protéine tau dans certaines tumeurs peut être un élément pouvant expliquer le manque d'efficacité pour de faibles concentrations de HDACi utilisés en clinique. Selon les bases de données, la protéine tau est retrouvée dans plusieurs tumeurs solides et semble peu représentée dans les tumeurs hématologiques (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186868-MAPT/pathology>). L'enjeu majeur aujourd'hui est donc de potentialiser l'effet de ces traitements dans les tumeurs solides. Notre étude est particulièrement originale car elle identifie tau comme facteur de résistance aux HDACi dans certains cancers. Elle permet également de montrer que l'inhibition de l'expression de *MAPT*, ici par un shRNA, rend ces thérapies efficaces à des doses plus faibles. Aussi, il a été montré que beaucoup d'inhibiteurs de HDAC, notamment la TSA utilisée dans cette étude, présente des effets secondaires trop important pour être envisagée en clinique (Shah, 2019). Ainsi, cibler des protéines comme tau qui sont des facteurs de résistance pour ces traitements pourrait permettre d'envisager des concentrations thérapeutiques plus faibles afin d'éviter les effets secondaires tout en

conservant une efficacité. Une des perspectives de ce travail consisterait à étudier cet effet de tau *in vivo*. De la même façon que nous l'avons fait dans l'étude 1 « *Implication de la protéine tau dans les mécanismes de réparation de l'ADN dans les cancers* », il serait possible de réaliser des xénogreffes de tumeurs tau-positives et tau-négatives et d'étudier leur réponse aux inhibiteurs de HDAC. Des résultats positifs seraient alors prometteurs pour envisager à nouveaux les inhibiteurs des HDAC dans le traitement des cancers résistants.

Notre troisième étude présente un effet de tau dans la régulation du stress oxydant mais ne permet pas encore d'en comprendre tous les mécanismes. Nous avons trouvé que l'expression de tau dans plusieurs lignées de cellules tumorales est associée à un stress basal moins important et limite l'effet de molécules induisant un stress oxydant. Nous observons en parallèle des modifications de la localisation et de la morphologie des mitochondries bien que nous n'ayons pas pu pour le moment établir de lien clair entre ces modifications et la diminution de stress oxydant. Nous avons ciblé la mitochondrie pour tenter d'expliquer la régulation du stress oxydant apportée par tau pour deux raisons : premièrement, la mitochondrie est une source importante de genèse des EROs et, deuxièmement, nous avons remarqué que l'induction d'un stress oxydant par la ménadione ou le tBHP augmentait la colocalisation entre tau et la mitochondrie. Afin de confirmer que l'effet de tau dans la régulation du stress oxydant est due à une fonction mitochondriale, il pourrait être intéressant d'utiliser des modèles de cellules déplétées en mitochondries Rho0 (Chandel and Schumacker, 1999) dans les cellules tau-positives. En complément, il est connu que la régulation du stress oxydant est principalement réalisée dans la cellule par les protéines de détoxification telles que la GPx, PRx ou encore la catalase. Nous n'avons pas étudié ici les potentiels effets de tau sur l'expression ou l'activation de ces enzymes, pas plus que sur des facteurs de transcription tels que Nrf2 ou FOXO, impliqués dans la régulation du stress oxydant (Kansanen *et al.*, 2013; Akasaki *et al.*, 2014). Ces pistes constituent une perspective intéressante étant donné que ces protéines sont fréquemment dérégulées dans les cancers ainsi que dans les neurones présentant une pathologie tau (Fão, Mota and Rego, 2019). Dans une étude réalisée sur le rôle de tau dans le maintien de l'hétérochromatine, il a été suggéré que la perte d'hétérochromatine dans des cellules dépourvues en tau pouvait être due à des dommages oxydatifs (Frost, Hemberg, Lewis and Mel B. Feany, 2014). La stabilité génomique apportée par tau peut donc également être apportée par une prévention du stress oxydant.

Il est intéressant de noter que les différentes molécules utilisées dans ces traitements dont l'efficacité dépend de la protéine tau ont des effets similaires. En effet, l'endommagement de l'ADN, le stress oxydant induisant des modifications de base ainsi que les modifications épigénétiques apportées par des épidrogues génèrent de l'instabilité génomique. La protéine tau peut donc être considérée comme une protéine de stabilité génomique. Aussi, le traitement des patients utilise souvent une combinaison de plusieurs molécules telles que les anthracyclines et taxanes pour les chimiothérapies de première ligne pour les cancers mammaires métastatiques (Telli and Carlson, 2009), des agents alkylants et des inhibiteurs de topoisomérase (étoposide ou danorubicine) pour les leucémies (Watts and Nimer, 2018) ou encore taxane et carboplatine pour les cancers ovariens avancés (Marchetti *et al.*, 2010). L'intérêt de l'utilisation de combinaisons de plusieurs molécules repose sur les effets synergiques qu'elles présentent. Par exemple, de faibles concentrations en HDACi comme le sodium butyrate ou la TSA entraînent une potentialisation de DDA tels que la doxorubicine, l'étoposide, le cisplatine ou encore le 5-FU (Kurz *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Marchion *et al.*, 2005). Les auteurs de ces études expliquent que l'hyperacétylation induite par les HDACi permet une ouverture de la chromatine et une meilleure accessibilité pour ces poisons de la topoisomérase II, agents alkylants et antimétabolites. La protéine tau peut donc constituer une résistance non pas à une molécule en particulier mais à une séance de chimiothérapie ou de radiothérapie.

Les fonctions de tau dans la régulation du stress oxydant et dans l'augmentation d'activité HR nous laisse penser que tau pourrait être impliquée dans la prévention d'un autre type de stress cellulaire : le stress réplcatif. Ce dernier est défini comme un ralentissement ou un arrêt des fourches de réplication menant à des régions non ou mal répliquées et induisant une instabilité génomique. Cette instabilité est notamment caractérisée par la formation de centrosomes surnuméraires, des ponts entre les chromatides pendant l'anaphase (*anaphase bridges*) ou encore le regroupement de protéines 53BP1 dans une structure appelée corps nucléaires de 53BP1 (*53BP1 nuclear bodies*) (Lukas *et al.*, 2011; Wilhelm *et al.*, 2019). Ce type d'évènement peut arriver lors de l'oxydation du pool de bases puriques et pyrimidiques de l'ADN par un stress oxydant altérant ainsi la réplication de l'ADN (Wilhelm *et al.*, 2016). En raison de la nature toxique du stress réplcatif, celui-ci est fortement recherché dans le traitement des cancers (Zhu *et al.*, 2020). Toutefois, les altérations retrouvées au niveau des fourches de réplcations pendant un tel stress peuvent être résolues par HR (Wilhelm *et al.*, 2014). Dans notre étude, nous montrons que la protéine tau limite la formation d'un stress oxydant et améliore l'efficacité de la recombinaison homologue. La protéine tau pourrait donc avoir un effet dans la prévention du stress



réplicatif. Des résultats préliminaires que nous avons obtenus montrent une formation de 53BP1 nuclear bodies plus fréquente dans les MCF7 shTau (figure annexe 1) ainsi que des cellules présentant des anaphases bridges (figure annexe 2). Ces résultats devront être confirmés et le rôle de tau dans la prévention du stress répliatif étudié de manière plus approfondie.

Les effets de tau décrits ici s'inscrivent dans un contexte de résistance thérapeutique des cancers. Cependant, dans ce travail, nous avons décrit de nouvelles fonctions qui pourraient être retrouvées dans les neurones et expliquer en partie certains évènements physiopathologiques caractéristiques des tauopathies. Le rôle de tau que nous avons établi dans l'organisation et le maintien de l'hétérochromatine en réponse aux HDACi complète les observations faites par plusieurs équipes sur les fonctions de tau dans les neurones (Frost, Hemberg, Lewis and Mel B. Feany, 2014; Mansuroglu *et al.*, 2016b). En effet, dans ce travail de thèse, nous proposons une explication mécanistique à la perte d'hétérochromatine et à la réexpression de gènes normalement réprimés qui est observée dans les tauopathies. Le rôle de tau dans la régulation du stress oxydant peut également être transposé aux cellules neuronales dans un contexte neuropathologique. Effectivement, les neurones en dégénérescence partagent cette caractéristique d'exhiber de forts niveaux de stress oxydant commune aux cellules cancéreuses. Bien que les mécanismes en jeu dans ces deux types cellulaires soient différents, des altérations mitochondriales sont retrouvées dans ces deux pathologies. Dans les tauopathies comme la MA, une relation entre la perte de tau et des dysfonctions des mitochondries a été suggérée (Cabezas-Opazo *et al.*, 2015). Bien que le lien entre la morphologie/localisation des mitochondries et la régulation du stress oxydant ne soit pas totalement établi dans ce travail, notre étude pourrait permettre de donner un élément de compréhension sur l'origine du stress oxydant dans les tauopathies. Enfin, le rôle de tau dans les activités de réparation des CDB pourrait également être transposé aux cellules neuronales. En effet, les CDB de l'ADN sont une des caractéristiques des neurones en dégénérescence. L'un des principaux éléments induisant ces dommages est le stress oxydant, omniprésent dans ce type de pathologies. Dans les neurones, les dommages oxydatifs sont majoritairement réparés par la BER alors que les CDB le sont par la NHEJ (Fishel, Vasko and Kelley, 2007). Ceci est expliqué dans la littérature par le fait que les neurones étant post-mitotiques, ils ne prolifèrent plus et ne peuvent pas utiliser une réparation basée sur une homologie de séquence retrouvée sur une chromatide sœur en phase S. En théorie donc, la HR semble incompatible avec ces cellules post-mitotiques. Dans ce contexte, nous pourrions imaginer que seul l'effet de tau sur la NHEJ soit retrouvé dans les neurones. Néanmoins, il a été montré que des cellules en phase G0/G1, n'était pas totalement dépourvues de réparation de type HR. Wei et collègue

ont mis en évidence que l'apparition de CDB dans des régions transcriptionnellement actives, induit le recrutement des protéines RPA1, Rad51C, Rad51 et Rad52, des protéines spécifiques de la HR. Cette réparation nécessite alors la présence de la protéine B du syndrome Cockayne et la présence d'un ARN dans cette région codante. Ces travaux montrent que la HR peut dans certains cas être efficace grâce à l'utilisation d'un ARN comme homologie de séquence en s'affranchissant ainsi d'une chromatide sœur (Wei *et al.*, 2015). Récemment, Welty et al ont retrouvé un mécanisme similaire. Les auteurs ont confirmé que l'apparition d'une CDB dans une région transcriptionnellement active du génome de neurones pouvait utiliser un ARNm « naissant » comme *template*, et ont précisé que ce mécanisme était dépendant de la protéine de recombinaison Rad52 (Welty *et al.*, 2018). Aux vues des fonctions de tau dans la HR dans les cancers, il est donc possible qu'elle intervienne également dans ce type de réparation dans les neurones, d'autant plus que l'étude de Welty et al montre que ce mécanisme est altéré dans la MA (Welty *et al.*, 2018). Par conséquent, des fonctions de tau établies dans les cancers pourraient être transposées dans les neurones dégénérants.

De la même façon, des mécanismes impliquant tau dans ces neurones pourraient être transposés dans les cancers. Un de ces mécanismes concerne la propagation de la pathologie tau dans le cerveau. Effectivement, dans la MA, l'évolution de cette propagation décrite par les stades Braak (Braak and Braak, 1991) suit une évolution spatio-temporelle. Une hypothèse permettant de l'expliquer stipule que la protéine tau est sécrétée puis transférée dans des neurones voisins. Cependant, tau est dépourvue d'une quelconque séquence d'adressage. Pourtant, celle-ci peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire, de la même façon que l'interleukine-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) dépourvue elle aussi de séquence d'adressage. Certaines études ont néanmoins montré que la souche sauvage de tau peut être transmise de neurone en neurone par son domaine N-terminal (Kim *et al.*, 2010) ou transportée dans des exosomes entre des cellules de neuroblastome M1C et dans le liquide cébrospinal (LCS) (Saman *et al.*, 2012). En plus des neurones, les exosomes sont fréquemment utilisés par les cellules immunitaires, les cellules stromales mais également les cellules cancéreuses pour communiquer (Kalluri, 2016). Dans l'adénocarcinome ductal pancréatique, la présence d'exosomes possédant de l'ADN génomique comportant les mutations de *KRAS* et *TP53* a été rapportée. Un tel transfert de matériel génomique possédant des mutations impliquées dans la tumorigénèse est donc critique dans le développement d'une masse tumorale agressive (Kahlert *et al.*, 2014). En plus des acides nucléiques, les protéines peuvent également être concernées par le transport vésiculaire. Par l'intermédiaire de microvésicules appelées « oncosomes », Al-Nedawi et al ont rapporté un transfert de la forme tronquée et oncogénique du

récepteur EGFR (EGFRvIII) de cellules de gliomes vers des cellules du même gliome qui en sont dépourvues (Al-Nedawi *et al.*, 2008). Des études complémentaires à celles réalisées chez les patients atteints de tauopathies pourraient permettre de déterminer si le couple tau-exosomes dans le cerveau est également retrouvé dans les cancers. L'existence d'un tel complexe signifierait que les différentes fonctions de tau favorables aux cellules cancéreuses pourraient alors être étendues à tout un ensemble de cellules tumorales qui n'exprimerait pas *MAPT* au départ.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse s'inscrivent dans un contexte où la protéine tau a été associée à une résistance thérapeutique aux taxanes en premier lieu dans les cancers mammaires (Rouzier *et al.*, 2005). Les études qui suivirent ont permis d'étendre ce rôle à d'autres tumeurs (Mimori *et al.*, 2006; Smoter *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Yamauchi *et al.*, 2017). À travers nos études, nous étendons cet effet de résistance thérapeutique à des traitements de chimiothérapies à base de DDA et HDACi et de radiothérapie. Nous avons fait le choix pour cette étude, d'utiliser principalement des lignées cellulaires issues de carcinomes mammaires (MCF7 et MDA-MB-231) puisqu'ils représentent une majorité des études réalisées sur la relation tau-cancers (Rouzier *et al.*, 2005; Spicakova *et al.*, 2010; Bonneau *et al.*, 2015). Il existe cependant une grande hétérogénéité des cancers et il serait alors intéressant de vérifier si les résultats de ce travail de thèse sont retrouvés pour d'autres types tumoraux. Cette tentative de généralisation des rôles de tau dans plusieurs cancers peut être intéressante en raison de récentes études qui lui attribuent un effet opposé dans les tumeurs cérébrales.

En effet, en dépit de l'émergence de travaux démontrant que tau est un mauvais pronostic dans les cancers mammaires, prostatiques, ovariens ou encore gastriques, son expression dans les gliomes de bas grade (GBG) a été corrélée à une meilleure survie des patients. Dans une étude, les auteurs ont mis en évidence une association entre l'expression de *MAPT* et une augmentation de la quantité d'effecteurs apoptotiques tels que CASP9, CYC1, CRADD, COX7A2L et UQCRC2. À l'inverse, dans les GBG exprimant faiblement *MAPT*, ils identifièrent une augmentation de 28 effecteurs de prolifération (Zaman *et al.*, 2019). Ceci étant vrai pour les GBG, les auteurs ont confirmé que cet effet ne l'était pas pour les mélanomes et les carcinomes mammaires ce qui corrobore de précédentes études (Rouzier *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 2010a). Récemment, l'équipe de Gargini a confirmé ces travaux. En compilant les résultats des statuts génomiques et transcriptomiques de gènes impliqués dans des processus neurodégénératifs et en analysant les données de The Cancer Genome Atlas (TCGA), les auteurs ont identifié une corrélation inverse entre l'expression de *MAPT* et l'agressivité de ces tumeurs (Gargini, Segura-Collar

and Sánchez-Gómez, 2019). Dans une autre étude, l'expression de tau a été associée à une dégradation du récepteur EGFR limitant ainsi la transformation mésenchymale/péricyte-like connue pour être impliquée dans l'agressivité tumorale et la radiorésistance (Ahmed and Li, 2008; Bai *et al.*, 2015). Par cette inhibition, la protéine tau le processus d'angiogenèse dans les GBG et est alors caractéristique d'un cancer moins agressif (Gargini *et al.*, 2020). La protéine tau constitue donc un mauvais pronostic dans certains cancers mammaires, ovariens ou prostatiques mais semble être un bon pronostic dans d'autres. Cette dualité des effets d'une même protéine peut être due à différents éléments telles que l'origine tissulaire, le microenvironnement tumoral, l'homéostasie cellulaire ou encore le protéome, propres à chaque tumeur. Les mêmes fonctions d'une protéine peuvent donc produire des effets différents. Par exemple, il a été montré que la protéine WISP-1 (*Wnt-1 inducible signalling pathway-1*) a un effet pro-tumoral dans les cancers hépatiques, colorectaux et mammaires alors qu'il a un effet anti-tumoral dans les cancers pulmonaires et prostatiques (Feng and Jia, 2016). L'hétérogénéité qui existe entre chaque type tumoral fait qu'il n'y a pas LE cancer mais DES cancers. Dans ce contexte, il n'est donc pas étonnant qu'un gène comme *MAPT*, codant une protéine pléiotrope et exprimé dans des tissus très différents d'un point de vue physiopathologique produise des effets qui peuvent être opposés les uns aux autres.

L'étude des rôles la protéine tau dans les cancers n'est donc qu'à ses balbutiements. Les mécanismes menant à sa surexpression, les voies de signalisation dans lesquelles elle peut potentiellement être impliquée ainsi que la résistance thérapeutique sont pour le moment peu connus. Seulement, bien qu'il soit important de pouvoir décrire l'ensemble des mécanismes menant à une résistance thérapeutique, le traitement des patients reste l'objectif ultime de la recherche. Depuis l'étude de Rouzier et al en 2005, beaucoup d'équipes de recherche s'accordent sur l'importance de neutraliser tau chez les patients ayant des cancers résistants (Rouzier *et al.*, 2005; Mimori *et al.*, 2006; Smoter *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Bonneau *et al.*, 2015). La perspective la plus importante à considérer et donc de trouver la thérapie anti-tau la plus prometteuse. Quelques pistes peuvent être envisagées.

D'abord, il serait possible de cibler directement les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant la réexpression de *MAPT*. Par exemple, quelques études ont établi que des tumeurs mammaires dépendant de stimuli hormonaux pour croître affichaient de forts niveaux de tau. Ces études ont notamment trouvé la présence d'une séquence ERE en amont du promoteur de *MAPT* pouvant réguler son expression. Les traitements anti-hormonaux tels que le tamoxifène et fulvestrant, des anti-

œstrogènes ou l'inhibiteur d'aromatase létrozole sont utilisés pour le traitement de ces cancers hormonaux-dépendants. Le fulvestrant a par ailleurs démontré un effet de diminution d'expression de *MAPT* (Pentheroudakis *et al.*, 2009; Ikeda *et al.*, 2010b). Expérimentalement, l'administration d'ARN interférents (siRNA ou shRNA) dirigés contre tau a montré des effets prometteurs sur une réduction de son expression *in cellulo* dans notre étude et d'autres (Rouzier *et al.*, 2005; Bonneau *et al.*, 2015). En clinique, l'injection de siRNA n'est actuellement pas utilisée dans les tauopathies mais a montré des effets positifs chez certains patients atteints de cancers (Wittrup and Lieberman, 2015; Zuckerman and Davis, 2015). Bien que cette approche soit intéressante d'un point de vue expérimental, les effets off-targets possibles en clinique restent tout de même importants. À l'inverse, l'utilisation d'oligonucléotides antisens (ASO, *Antisense Oligonucleotide*) pourrait être envisagée. Un ASO dirigé contre *MAPT* et développé par l'entreprise Ionis Pharmaceutical a permis de montrer, dans les phases pré-cliniques, une réduction de protéines tau totale dans des souris et primates non-humains (DeVos *et al.*, 2017). L'ASO BIIB080 de Ionis est actuellement en phase 1 et a montré très récemment, une réduction de protéine tau totale de 30% à 50% sans effets secondaires importants chez l'Homme.

Une autre approche consisterait non pas à empêcher la transcription de son gène, mais de neutraliser la protéine tau dans la cellule cancéreuse. Ces dernières années, grâce aux efforts réalisés par les équipes de recherche travaillant sur les tauopathies, des immunothérapies anti-tau ont connu un essor important. Parmi elles, des immunothérapies passives (Chai *et al.*, 2011; Sankaranarayanan *et al.*, 2015) et actives (Boutajangout, Quartermain and Sigurdsson, 2010; Theunis *et al.*, 2013) ont montré des effets prometteurs dans la clairance de tau dans différentes phases pré-cliniques. Cependant, il a été montré que la région effectrice Fc des immunoglobulines G (IgG) n'a pas d'effets sur la réduction de tau et pouvait mener à des effets secondaires comme une inflammation importante (Lee *et al.*, 2016). Dans ce contexte, des anticorps à domaine unique également appelés VHHs (*variable heavy chain of the heavy chain only antibody*) ou nanobodies provenant des *Camelidae* ont été développés. Deux caractéristiques propres aux nanobodies en font des outils intéressants d'un point de vue thérapeutique. En effet, leur taille relativement plus petite que les IgG classiques pourrait faciliter leur entrée dans les cellules. De plus, leur flexibilité intrinsèque permettrait de neutraliser des protéines même incluses dans des complexes cellulaires particuliers (Bannas, Hambach and Koch-Nolte, 2017). Dans les cancers, différents VHHs ont été utilisés contre le récepteur EGFR (Schmitz *et al.*, 2013), la protéine c-MET *hepatocyte growth factor receptor* (Slørdahl *et al.*, 2013) ou encore le récepteur HER2 (*epidermal growth factor receptor*) (Khaleghi *et al.*, 2017). Récemment, un VHH nommé F8-2 dirigé

spécifiquement contre un épitope de la région C-terminale de la protéine tau a été développé et a démontré une forte affinité pour tau et permet son élimination *in cellulo* et *in vivo* (Dupré *et al.*, 2019). Il serait alors intéressant de déterminer si ce type d'anticorps peut être efficace dans des tumeurs tau-positives.

En parallèle, une étude rétrospective qui permettrait de chercher une corrélation entre l'expression de *MAPT* chez des patients et l'efficacité de certains traitements pourrait être réalisée. En complément, l'analyse de tissus issus de biobanques de patients pourrait permettre de déterminer si la protéine tau est prépondérante chez les patients ne répondant pas ou peu aux thérapies. Cette approche intéressante a notamment été utilisée par Rouzier *et al.* pour montrer pour la première fois que tau pouvait être associée à une résistance thérapeutique au Taxol (Rouzier *et al.*, 2005). Nous pourrions alors utiliser cette même méthode pour montrer que tau est associée à une résistance à des traitements à base de DDA ou molécules modifiant l'épigénome.

La protéine tau a été découverte dans les neurones où elle y a été intensément étudiée en raison de son implication dans les tauopathies. Pendant longtemps, il a été communément admis qu'elle n'avait qu'une fonction d'assemblage et de stabilisation des microtubules. Il a fallu attendre plus de deux décennies pour comprendre qu'elle était en réalité impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Aujourd'hui, nous savons que tau est également retrouvée dans certains cancers. Naturellement, seul son rôle microtubulaire a été associé à un rôle dans la résistance thérapeutique face aux taxanes. La suite logique de cette généalogie suppose que l'on étudie l'ensemble des fonctions de tau dans les cancers, leurs conséquences sur la croissance tumorale, la formation de métastases ou encore la résistance face à plusieurs types de traitements. Ces études à venir devront permettre de réaliser l'impact qu'a cette protéine dans le développement des cancers. À travers les différentes thérapies anti-tau émergentes et qui restent à développer, la recherche en cancérologie devra continuer à concentrer ses efforts sur ces cancers résistants. En effet, la survie nette à 5 ans ne s'est pas améliorée pour les cancers de mauvais pronostics tels que les cancers cérébraux. Elle ne s'est pas non plus améliorée de manière suffisante pour les cancers dont l'incidence augmente annuellement comme les carcinomes pulmonaires ou prostatiques. Dans le monde, les cancers ont touché plus de 18 000 000 de nouvelles personnes et en ont emporté 9 600 000 pour la seule année 2018 (Global Cancer Statistics 2018). Pour ce qui est de la MA, on dénombre environ 35 600 000 personnes atteintes sur le globe alors qu'aucun traitement curatif n'existe (*Alzheimer Reports*). L'ensemble des pathologies touchant l'être humain a entraîné le décès

d'environ 55 400 000 individus en 2019 et constitue autant de crises sanitaires qui ne font que croître au fur et à mesure du temps. La recherche permet de comprendre ces maladies. La médecine permet de les éradiquer. Des travaux ont montré que tau était un facteur de résistance aux poisons du fuseau mitotique. Cette thèse a permis de montrer que tau est un facteur de résistance aux agents endommageant l'ADN et à d'autres traitements. La suite de ce travail devra permettre à la médecine d'éradiquer ces cancers résistants chez toutes celles et ceux qui, chaque jour, se battent contre la maladie.

# **BIBLIOGRAPHIE**



# A

Abolhassani, N. *et al.* (2017) 'Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain', *Mechanisms of Ageing and Development*, 161(Pt A), pp. 95–104. doi:10.1016/j.mad.2016.05.005.

Ader, I. *et al.* (2002) 'The radioprotective effect of the 24 kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit', *Oncogene*, 21(42), pp. 6471–6479. doi:10.1038/sj.onc.1205838.

Adhikari, S. *et al.* (2008) 'Targeting base excision repair for chemosensitization', *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8(4), pp. 351–357. doi:10.2174/187152008784220366.

Aggarwal, B.B. *et al.* (2006) 'TNF blockade: an inflammatory issue', *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, (56), pp. 161–186. doi:10.1007/3-540-37673-9\_10.

Ahmed, K.M. and Li, J.J. (2008) 'NF- $\kappa$ B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation', *Free radical biology & medicine*, 44(1), pp. 1–13. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.022.

Ahn, J., Urist, M. and Prives, C. (2004) 'The Chk2 protein kinase', *DNA repair*, 3(8–9), pp. 1039–1047. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.033.

Akasaki, Y. *et al.* (2014) 'FoxO transcription factors support oxidative stress resistance in human chondrocytes', *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 66(12), pp. 3349–3358. doi:10.1002/art.38868.

Albers, D.S. and Augood, S.J. (2001) 'New insights into progressive supranuclear palsy', *Trends in Neurosciences*, 24(6), pp. 347–353. doi:10.1016/s0166-2236(00)01794-x.

Albrecht, D. *et al.* (2020) 'Associations between Vascular Function and Tau PET Are Associated with Global Cognition and Amyloid', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 40(44), pp. 8573–8586. doi:10.1523/JNEUROSCI.1230-20.2020.

Alexandre, J. *et al.* (2006) 'Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir', *Journal of the National Cancer Institute*, 98(4), pp. 236–244. doi:10.1093/jnci/djj049.

Allen, C., Her, S. and Jaffray, D.A. (2017) 'Radiotherapy for Cancer: Present and Future', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109, pp. 1–2. doi:10.1016/j.addr.2017.01.004.

Alli, E. *et al.* (2007) 'Reversal of stathmin-mediated resistance to paclitaxel and vinblastine in human breast carcinoma cells', *Molecular Pharmacology*, 71(5), pp. 1233–1240. doi:10.1124/mol.106.029702.

Al-Mehdi, A.-B. *et al.* (2012) 'Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription', *Science Signaling*, 5(231), p. ra47. doi:10.1126/scisignal.2002712.

Al-Nedawi, K. *et al.* (2008) 'Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells', *Nature Cell Biology*, 10(5), pp. 619–624. doi:10.1038/ncb1725.

- An, J. *et al.* (2010) 'DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression', *BMC molecular biology*, 11, p. 18. doi:10.1186/1471-2199-11-18.
- Andre, F. *et al.* (2007) 'Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(7), pp. 2061–2067. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2078.
- Andreadis, A. *et al.* (1996) 'A tau promoter region without neuronal specificity', *Journal of Neurochemistry*, 66(6), pp. 2257–2263. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66062257.x.
- Andreadis, A. (2005) 'Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1739(2–3), pp. 91–103. doi:10.1016/j.bbadis.2004.08.010.
- Andreadis, A., Broderick, J.A. and Kosik, K.S. (1995) 'Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons', *Nucleic Acids Research*, 23(17), pp. 3585–3593. doi:10.1093/nar/23.17.3585.
- Arcamone, F. *et al.* (1969) 'Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceitius* var. *caesius*', *Biotechnology and Bioengineering*, 11(6), pp. 1101–1110. doi:10.1002/bit.260110607.
- Ardura, J.A. *et al.* (2020) 'Role of Calcium Signaling in Prostate Cancer Progression: Effects on Cancer Hallmarks and Bone Metastatic Mechanisms', *Cancers*, 12(5), p. 1071. doi:10.3390/cancers12051071.
- Atlante, A. *et al.* (2008) 'A peptide containing residues 26-44 of tau protein impairs mitochondrial oxidative phosphorylation acting at the level of the adenine nucleotide translocator', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1777(10), pp. 1289–1300. doi:10.1016/j.bbabi.2008.07.004.
- Augustinack, J.C. *et al.* (2002) 'Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica*, 103(1), pp. 26–35. doi:10.1007/s004010100423.
- Avila, J. *et al.* (2016) 'Tau Structures', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, p. 262. doi:10.3389/fnagi.2016.00262.
- Aykin-Burns, N. *et al.* (2011) 'Sensitivity to low-dose/low-LET ionizing radiation in mammalian cells harboring mutations in succinate dehydrogenase subunit C is governed by mitochondria-derived reactive oxygen species', *Radiation Research*, 175(2), pp. 150–158. doi:10.1667/rr2220.1.
- Azimi, I. *et al.* (2017) 'Hypoxia-induced reactive oxygen species mediate N-cadherin and SERPINE1 expression, EGFR signalling and motility in MDA-MB-468 breast cancer cells', *Scientific Reports*, 7(1), p. 15140. doi:10.1038/s41598-017-15474-7.

## B

- Bai, M. *et al.* (2015) 'The Accomplices of NF-κB Lead to Radioresistance', *Current Protein & Peptide Science*, 16(4), pp. 279–294. doi:10.2174/138920371604150429152328.

- Bajor, M. *et al.* (2020) 'Triple Combination of Ascorbate, Menadione and the Inhibition of Peroxiredoxin-1 Produces Synergistic Cytotoxic Effects in Triple-Negative Breast Cancer Cells', *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(4), p. E320. doi:10.3390/antiox9040320.
- Bannas, P., Hambach, J. and Koch-Nolte, F. (2017) 'Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics', *Frontiers in Immunology*, 8, p. 1603. doi:10.3389/fimmu.2017.01603.
- Barjaktarovic, Z. *et al.* (2011) 'Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays', *PLoS One*, 6(12), p. e27811. doi:10.1371/journal.pone.0027811.
- Barlogie, B. *et al.* (1990) 'High-dose melphalan and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for refractory multiple myeloma', *Blood*, 76(4), pp. 677–680.
- Barnham, K.J., Masters, C.L. and Bush, A.I. (2004) 'Neurodegenerative diseases and oxidative stress', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(3), pp. 205–214. doi:10.1038/nrd1330.
- Barot, H.A., Laverick, M. and Nias, A.H. (1985) 'The radiomimetic properties of a platinum drug', *The British Journal of Radiology*, 58(685), pp. 51–62. doi:10.1259/0007-1285-58-685-51.
- Baselga, J. *et al.* (2009) 'Phase II genomics study of ixabepilone as neoadjuvant treatment for breast cancer', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(4), pp. 526–534. doi:10.1200/JCO.2007.14.2646.
- Baskar, R. *et al.* (2012) 'Cancer and radiation therapy: current advances and future directions', *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), pp. 193–199. doi:10.7150/ijms.3635.
- Bellacosa, A. *et al.* (1995) 'Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas', *International Journal of Cancer*, 64(4), pp. 280–285. doi:10.1002/ijc.2910640412.
- Bennett, J.M. and Reich, S.D. (1979) 'Bleomycin', *Annals of Internal Medicine*, 90(6), pp. 945–948. doi:10.7326/0003-4819-90-6-945.
- Bennett, R.E. *et al.* (2018) 'Tau induces blood vessel abnormalities and angiogenesis-related gene expression in P301L transgenic mice and human Alzheimer's disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(6), pp. E1289–E1298. doi:10.1073/pnas.1710329115.
- von Bergen, M. *et al.* (2000) 'Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), pp. 5129–5134. doi:10.1073/pnas.97.10.5129.
- Berrieman, H.K., Lind, M.J. and Cawkwell, L. (2004) 'Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy?', *The Lancet. Oncology*, 5(3), pp. 158–164. doi:10.1016/S1470-2045(04)01411-1.
- Bétermier, M., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2014) 'Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process?', *PLoS genetics*, 10(1), p. e1004086. doi:10.1371/journal.pgen.1004086.
- Beucher, A. *et al.* (2009) 'ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2', *The EMBO journal*, 28(21), pp. 3413–3427. doi:10.1038/emboj.2009.276.

- Bey, E.A. *et al.* (2007) 'An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by  $\beta$ -lapachone', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(28), pp. 11832–11837. doi:10.1073/pnas.0702176104.
- Bhargava, R., Onyango, D.O. and Stark, J.M. (2016) 'Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance', *Trends in genetics: TIG*, 32(9), pp. 566–575. doi:10.1016/j.tig.2016.06.007.
- Bhattacharya, S. *et al.* (2017) 'RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity', *Nucleic Acids Research*, 45(8), pp. 4590–4605. doi:10.1093/nar/gkx126.
- Bi, J. *et al.* (2015) 'Expression of DNA damage checkpoint 53BP1 is correlated with prognosis, cell proliferation and apoptosis in colorectal cancer', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), pp. 6070–6082.
- Bielak-Zmijewska, A. *et al.* (2014) 'A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta', *Biogerontology*, 15(1), pp. 47–64. doi:10.1007/s10522-013-9477-9.
- Bolden, J.E., Peart, M.J. and Johnstone, R.W. (2006) 'Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(9), pp. 769–784. doi:10.1038/nrd2133.
- Bollag, D.M. *et al.* (1995) 'Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action', *Cancer Research*, 55(11), pp. 2325–2333.
- Bonneau, C. *et al.* (2015) 'Predictive and Prognostic Value of the TauProtein in Breast Cancer', *Anticancer Research*, 35(10), pp. 5179–5184.
- Bothmer, A. *et al.* (2010) '53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination', *The Journal of Experimental Medicine*, 207(4), pp. 855–865. doi:10.1084/jem.20100244.
- Botuyan, M.V. *et al.* (2006) 'Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair', *Cell*, 127(7), pp. 1361–1373. doi:10.1016/j.cell.2006.10.043.
- Bou Samra, E. *et al.* (2017) 'A role for Tau protein in maintaining ribosomal DNA stability and cytidine deaminase-deficient cell survival', *Nature Communications*, 8(1), p. 693. doi:10.1038/s41467-017-00633-1.
- Boutajangout, A., Quartermain, D. and Sigurdsson, E.M. (2010) 'Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(49), pp. 16559–16566. doi:10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010.
- Braak, H. and Braak, E. (1991) 'Neuropathological staging of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathologica*, 82(4), pp. 239–259. doi:10.1007/bf00308809.
- Braicu, C. *et al.* (2019) 'A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer', *Cancers*, 11(10). doi:10.3390/cancers11101618.
- Brandsma, I. and Gent, D.C. (2012) 'Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act', *Genome Integrity*, 3(1), p. 9. doi:10.1186/2041-9414-3-9.

Brion, J.P. *et al.* (1985) 'Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer'. Available at: <https://www.scinapse.io/papers/1621042331> (Accessed: 15 June 2021).

Brown, N.S. and Bicknell, R. (2001) 'Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer', *Breast Cancer Research : BCR*, 3(5), pp. 323–327. doi:10.1186/bcr315.

Brunet, A. *et al.* (1999) 'Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor', *Cell*, 96(6), pp. 857–868. doi:10.1016/s0092-8674(00)80595-4.

Bunting, S.F. *et al.* (2010) '53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks', *Cell*, 141(2), pp. 243–254. doi:10.1016/j.cell.2010.03.012.

Burgess, R.C. *et al.* (2014) 'Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin', *Cell Reports*, 9(5), pp. 1703–1717. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.060.

Butterfield, D.A., Swomley, A.M. and Sultana, R. (2013) 'Amyloid  $\beta$ -peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression', *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(8), pp. 823–835. doi:10.1089/ars.2012.5027.

## C

Cabezas-Opazo, F.A. *et al.* (2015) 'Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, p. 509654. doi:10.1155/2015/509654.

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

Cai, Y. *et al.* (2019) 'Integrative gene expression profiling reveals that dysregulated triple microRNAs confer paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer via co-targeting MAPT', *Cancer Management and Research*, 11, pp. 7391–7404. doi:10.2147/CMAR.S215427.

Caillet-Boudin, M.-L. *et al.* (2015) 'Regulation of human MAPT gene expression', *Molecular Neurodegeneration*, 10, p. 28. doi:10.1186/s13024-015-0025-8.

Caracciolo, D. *et al.* (2019) 'Alternative non-homologous end joining repair: a master regulator of genomic instability in cancer', *Precision Cancer Medicine*, 2(0). Available at: <https://pcm.amegroups.com/article/view/4925> (Accessed: 6 September 2021).

Carusillo, A. and Mussolino, C. (2020) 'DNA Damage: From Threat to Treatment', *Cells*, 9(7), p. E1665. doi:10.3390/cells9071665.

Castellani, R. *et al.* (1995) 'Evidence for oxidative stress in Pick disease and corticobasal degeneration', *Brain Research*, 696(1–2), pp. 268–271. doi:10.1016/0006-8993(95)00535-x.

Chaabane, W. and Appell, M.L. (2016) 'Interconnections between apoptotic and autophagic pathways during thiopurine-induced toxicity in cancer cells: the role of reactive oxygen species', *Oncotarget*, 7(46), pp. 75616–75634. doi:10.18632/oncotarget.12313.

- Chabner, B.A. and Roberts, T.G. (2005) 'Timeline: Chemotherapy and the war on cancer', *Nature Reviews. Cancer*, 5(1), pp. 65–72. doi:10.1038/nrc1529.
- Chabosseau, P. *et al.* (2011) 'Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome', *Nature Communications*, 2, p. 368. doi:10.1038/ncomms1363.
- Chai, X. *et al.* (2011) 'Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology and delay of disease progression', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(39), pp. 34457–34467. doi:10.1074/jbc.M111.229633.
- Chandel, N.S. *et al.* (1998) 'Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), pp. 11715–11720. doi:10.1073/pnas.95.20.11715.
- Chandel, N.S. and Schumacker, P.T. (1999) 'Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms', *FEBS letters*, 454(3), pp. 173–176. doi:10.1016/s0014-5793(99)00783-8.
- Chang, F. *et al.* (2003) 'Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy', *Leukemia*, 17(3), pp. 590–603. doi:10.1038/sj.leu.2402824.
- Chauderlier, A. *et al.* (2018) 'Tau/DDX6 interaction increases microRNA activity', *Biochimica Et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(8), pp. 762–772. doi:10.1016/j.bbagr.2018.06.006.
- Chaudhary, A.R. *et al.* (2018) 'Tau directs intracellular trafficking by regulating the forces exerted by kinesin and dynein teams', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 19(2), pp. 111–121. doi:10.1111/tra.12537.
- Chen, G. and Deng, X. (2018) 'Cell Synchronization by Double Thymidine Block', *Bio-protocol*, 8(17), p. e2994. doi:10.21769/BioProtoc.2994.
- Chen, I.-C., Sethy, B. and Liou, J.-P. (2020) 'Recent Update of HDAC Inhibitors in Lymphoma', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, p. 576391. doi:10.3389/fcell.2020.576391.
- Chen, J. *et al.* (1992) 'Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons', *Nature*, 360(6405), pp. 674–677. doi:10.1038/360674a0.
- Chen, J. *et al.* (2020) '53BP1 loss rescues embryonic lethality but not genomic instability of BRCA1 total knockout mice', *Cell Death and Differentiation*, 27(9), pp. 2552–2567. doi:10.1038/s41418-020-0521-4.
- Chen, L. *et al.* (2020) 'Clinical efficacy and safety of 6-thioguanine in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: A protocol for systematic review and meta-analysis', *Medicine*, 99(18), p. e20082. doi:10.1097/MD.00000000000020082.
- Chen, S. *et al.* (2010) 'HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons', *PloS One*, 5(5), p. e10848. doi:10.1371/journal.pone.0010848.
- Chen, W.T., Liu, W.K. and Yen, S.H. (1994) 'Expression of tau exon 8 in different species', *Neuroscience Letters*, 172(1–2), pp. 167–170. doi:10.1016/0304-3940(94)90688-2.

- Chen, Y. *et al.* (1998) 'Formation of plasmid DNA strand breaks induced by low-energy ion beam: indication of nuclear stopping effects', *Radiation and Environmental Biophysics*, 37(2), pp. 101–106. doi:10.1007/s004110050101.
- Cheng, K.C. *et al.* (1992) '8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions', *The Journal of Biological Chemistry*, 267(1), pp. 166–172.
- Cheng, Y. and Bai, F. (2018a) 'The Association of Tau With Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease', *Frontiers in Neuroscience*, 12, p. 163. doi:10.3389/fnins.2018.00163.
- Cheng, Y. and Bai, F. (2018b) 'The Association of Tau With Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease', *Frontiers in Neuroscience*, 12, p. 163. doi:10.3389/fnins.2018.00163.
- Choi, E. *et al.* (2012) 'Property-based optimization of hydroxamate-based  $\gamma$ -lactam HDAC inhibitors to improve their metabolic stability and pharmacokinetic profiles', *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(23), pp. 10766–10770. doi:10.1021/jm3009376.
- Cieri, D. *et al.* (2018) 'Tau localises within mitochondrial sub-compartments and its caspase cleavage affects ER-mitochondria interactions and cellular Ca<sup>2+</sup> handling', *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1864(10), pp. 3247–3256. doi:10.1016/j.bbadis.2018.07.011.
- Cipriani, G. *et al.* (2011) 'Alzheimer and his disease: a brief history', *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 32(2), pp. 275–279. doi:10.1007/s10072-010-0454-7.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y. and Kirschner, M.W. (1977) 'Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly', *Journal of Molecular Biology*, 116(2), pp. 227–247. doi:10.1016/0022-2836(77)90214-5.
- Clikeman, J.A. *et al.* (2001) 'Homologous recombinational repair of double-strand breaks in yeast is enhanced by MAT heterozygosity through  $\gamma$ KU-dependent and -independent mechanisms', *Genetics*, 157(2), pp. 579–589.
- Clouaire, T. *et al.* (2018) 'Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures', *Molecular Cell*, 72(2), pp. 250-262.e6. doi:10.1016/j.molcel.2018.08.020.
- Clouaire, T. and Legube, G. (2019) 'A Snapshot on the Cis Chromatin Response to DNA Double-Strand Breaks', *Trends in genetics: TIG*, 35(5), pp. 330–345. doi:10.1016/j.tig.2019.02.003.
- Clutton, S.M. *et al.* (1996) 'Radiation-induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures', *Carcinogenesis*, 17(8), pp. 1633–1639. doi:10.1093/carcin/17.8.1633.
- Coleman, K.A. and Greenberg, R.A. (2011) 'The BRCA1-RAP80 Complex Regulates DNA Repair Mechanism Utilization by Restricting End Resection', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(15), pp. 13669–13680. doi:10.1074/jbc.M110.213728.
- Collignon, J. *et al.* (2016) 'Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions', *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, 8, pp. 93–107. doi:10.2147/BCTT.S69488.
- Collis, S.J. *et al.* (2004) 'Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(48), pp. 49624–49632. doi:10.1074/jbc.M409600200.

Corazao-Rozas, P. *et al.* (2016) 'Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors', *Oncotarget*, 7(26), pp. 39473–39485. doi:10.18632/oncotarget.7790.

Corces, V.G. *et al.* (1980a) 'Effects of DNA on microtubule assembly', *European Journal of Biochemistry*, 105(1), pp. 7–16. doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb04468.x.

Corces, V.G. *et al.* (1980b) 'Effects of DNA on microtubule assembly', *European Journal of Biochemistry*, 105(1), pp. 7–16. doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb04468.x.

Cortés-Funes, H. and Coronado, C. (2007) 'Role of anthracyclines in the era of targeted therapy', *Cardiovascular Toxicology*, 7(2), pp. 56–60. doi:10.1007/s12012-007-0015-3.

Couchie, D. and Nunez, J. (1985) 'Immunological characterization of microtubule-associated proteins specific for the immature brain', *FEBS letters*, 188(2), pp. 331–335. doi:10.1016/0014-5793(85)80397-5.

Coupland, K.G. *et al.* (2014) 'DNA methylation of the MAPT gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E in vitro', *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 29(13), pp. 1606–1614. doi:10.1002/mds.25784.

Coupland, K.G. *et al.* (2016) 'Role of the Long Non-Coding RNA MAPT-AS1 in Regulation of Microtubule Associated Protein Tau (MAPT) Expression in Parkinson's Disease', *PLoS One*, 11(6), p. e0157924. doi:10.1371/journal.pone.0157924.

Cragg, C.L. and Kalisch, B.E. (2014) 'Nerve Growth Factor Enhances Tau Isoform Expression and Transcription in IMR32 Cells', *Neuroscience and Medicine*, 5(2), pp. 119–130. doi:10.4236/nm.2014.52015.

Cullen, J.J. *et al.* (2003) 'The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma', *Cancer Research*, 63(6), pp. 1297–1303.

## D

Dada, L.A. and Sznajder, J.I. (2011) 'Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS take center stage to orchestrate TNF- $\alpha$ -mediated inflammatory responses', *The Journal of Clinical Investigation*, 121(5), pp. 1683–1685. doi:10.1172/JCI57748.

Dai, Y. *et al.* (2005) 'Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation', *Molecular and Cellular Biology*, 25(13), pp. 5429–5444. doi:10.1128/MCB.25.13.5429-5444.2005.

Darlix, A. *et al.* (2019) 'The prognostic value of the Tau protein serum level in metastatic breast cancer patients and its correlation with brain metastases', *BMC cancer*, 19(1), p. 110. doi:10.1186/s12885-019-5287-z.

Dasari, S. and Tchounwou, P.B. (2014) 'Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action', *European journal of pharmacology*, 740, pp. 364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

Datta, S.R. *et al.* (1997) 'Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery', *Cell*, 91(2), pp. 231–241. doi:10.1016/s0092-8674(00)80405-5.



- David, D.C. *et al.* (2005) 'Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25), pp. 23802–23814. doi:10.1074/jbc.M500356200.
- Davies, K.J. and Doroshow, J.H. (1986) 'Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase', *The Journal of Biological Chemistry*, 261(7), pp. 3060–3067.
- Davydov, V., Hansen, L.A. and Shackelford, D.A. (2003) 'Is DNA repair compromised in Alzheimer's disease?', *Neurobiology of Aging*, 24(7), pp. 953–968. doi:10.1016/s0197-4580(02)00229-4.
- Dayal, D. *et al.* (2008) 'Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells', *The Biochemical Journal*, 413(1), pp. 185–191. doi:10.1042/BJ20071643.
- De Angelis, A. *et al.* (2010) 'Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function', *Circulation*, 121(2), pp. 276–292. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.895771.
- De Falco, E. *et al.* (2016) 'Role of NOX2 in mediating doxorubicin-induced senescence in human endothelial progenitor cells', *Mechanisms of Ageing and Development*, 159, pp. 37–43. doi:10.1016/j.mad.2016.05.004.
- Degiorgis, L. *et al.* (2020) 'Brain network remodelling reflects tau-related pathology prior to memory deficits in Thy-Tau22 mice', *Brain: A Journal of Neurology*, 143(12), pp. 3748–3762. doi:10.1093/brain/awaa312.
- Delaney, G. *et al.* (2005) 'The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines', *Cancer*, 104(6), pp. 1129–1137. doi:10.1002/cncr.21324.
- Derisbourg, M. *et al.* (2015) 'Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms', *Scientific Reports*, 5, p. 9659. doi:10.1038/srep09659.
- Descamps, S. *et al.* (2001a) 'Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), pp. 17864–17870. doi:10.1074/jbc.M010499200.
- Descamps, S. *et al.* (2001b) 'Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), pp. 17864–17870. doi:10.1074/jbc.M010499200.
- DeVos, S.L. *et al.* (2017) 'Tau Reduction Prevents Neuronal Loss and Reverses Pathological Tau Deposition and Seeding in Mice with Tauopathy', *Science translational medicine*, 9(374), p. eaag0481. doi:10.1126/scitranslmed.aag0481.
- Di Donato, M. *et al.* (2019) 'Nerve Growth Factor Induces Proliferation and Aggressiveness In Prostate Cancer Cells', *Cancers*, 11(6). doi:10.3390/cancers11060784.
- Dixit, R. *et al.* (2008) 'Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau', *Science (New York, N.Y.)*, 319(5866), pp. 1086–1089. doi:10.1126/science.1152993.
- Dobie, K.W. *et al.* (1999) 'Centromere proteins and chromosome inheritance: a complex affair', *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(2), pp. 206–217. doi:10.1016/S0959-437X(99)80031-8.

Dollé, L. *et al.* (2003) 'Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells', *Oncogene*, 22(36), pp. 5592–5601. doi:10.1038/sj.onc.1206805.

Don, S. *et al.* (2004) 'Neuronal-associated microtubule proteins class III beta-tubulin and MAP2c in neuroblastoma: role in resistance to microtubule-targeted drugs', *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(9), pp. 1137–1146.

Dong, Q. *et al.* (1995) 'A structural basis for a phosphoramidate mustard-induced DNA interstrand cross-link at 5'-d(GAC)', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), pp. 12170–12174. doi:10.1073/pnas.92.26.12170.

Doroshov, J.H. and Davies, K.J. (1986) 'Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical', *The Journal of Biological Chemistry*, 261(7), pp. 3068–3074.

Doskey, C.M. *et al.* (2016) 'Tumor cells have decreased ability to metabolize H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Implications for pharmacological ascorbate in cancer therapy', *Redox Biology*, 10, pp. 274–284. doi:10.1016/j.redox.2016.10.010.

Drubin, D.G. *et al.* (1985) 'Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors', *The Journal of Cell Biology*, 101(5 Pt 1), pp. 1799–1807. doi:10.1083/jcb.101.5.1799.

Drubin, D.G. and Kirschner, M.W. (1986) 'Tau protein function in living cells', *The Journal of Cell Biology*, 103(6 Pt 2), pp. 2739–2746. doi:10.1083/jcb.103.6.2739.

Duan, M. *et al.* (2020) 'Role of Nucleotide Excision Repair in Cisplatin Resistance', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), p. E9248. doi:10.3390/ijms21239248.

DuBoff, B., Götz, J. and Feany, M.B. (2012) 'Tau promotes neurodegeneration via DRP1 mislocalization in vivo', *Neuron*, 75(4), pp. 618–632. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.026.

Dupré, E. *et al.* (2019) 'Single Domain Antibody Fragments as New Tools for the Detection of Neuronal Tau Protein in Cells and in Mice Studies', *ACS chemical neuroscience*, 10(9), pp. 3997–4006. doi:10.1021/acscchemneuro.9b00217.

Durairaj, P. *et al.* (2006) 'Bleomycin-Induced Oxidative Stress and Lung Injury in Rats: Inhibition by Curcumin', *Letters in Drug Design & Discovery*, 3(10), pp. 714–722.

## E

Edwards, S.L. *et al.* (2008) 'Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2', *Nature*, 451(7182), pp. 1111–1115. doi:10.1038/nature06548.

Eftekhazadeh, B. *et al.* (2018) 'Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease', *Neuron*, 99(5), pp. 925–940.e7. doi:10.1016/j.neuron.2018.07.039.

Eisenberg-Bord, M. and Schuldiner, M. (2017) 'Ground control to major TOM: mitochondria-nucleus communication', *The FEBS journal*, 284(2), pp. 196–210. doi:10.1111/febs.13778.

Eke, I. *et al.* (2020) '53BP1/RIF1 signaling promotes cell survival after multifractionated radiotherapy', *Nucleic Acids Research*, 48(3), pp. 1314–1326. doi:10.1093/nar/gkz1139.

Elchuri, S. *et al.* (2005) 'CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life', *Oncogene*, 24(3), pp. 367–380. doi:10.1038/sj.onc.1208207.

Eliezer, Y. *et al.* (2009) 'The direct interaction between 53BP1 and MDC1 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of damage', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(1), pp. 426–435. doi:10.1074/jbc.M807375200.

Elion, G.B. (1989) 'The purine path to chemotherapy', *Science (New York, N.Y.)*, 244(4900), pp. 41–47. doi:10.1126/science.2649979.

El-Naggar, A.M. *et al.* (2019) 'Class I HDAC inhibitors enhance YB-1 acetylation and oxidative stress to block sarcoma metastasis', *EMBO reports*, 20(12), p. e48375. doi:10.15252/embr.201948375.

Eot-Houllier, G. *et al.* (2009) 'Histone deacetylase inhibitors and genomic instability', *Cancer Letters*, 274(2), pp. 169–176. doi:10.1016/j.canlet.2008.06.005.

Evens, A.M., Balasubramanian, L. and Gordon, L.I. (2005) 'Motexafin gadolinium induces oxidative stress and apoptosis in hematologic malignancies', *Current treatment options in oncology*, 6(4), pp. 289–296. doi:10.1007/s11864-005-0033-y.

## F

Fang, J.Y. and Richardson, B.C. (2005) 'The MAPK signalling pathways and colorectal cancer', *The Lancet. Oncology*, 6(5), pp. 322–327. doi:10.1016/S1470-2045(05)70168-6.

Fão, L., Mota, S.I. and Rego, A.C. (2019) 'Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases', *Ageing Research Reviews*, 54, p. 100942. doi:10.1016/j.arr.2019.100942.

Feissner, R.F. *et al.* (2009) 'Crosstalk signaling between mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS', *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, pp. 1197–1218. doi:10.2741/3303.

Feng, M. and Jia, S. (2016) 'Dual effect of WISP-1 in diverse pathological processes', *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, 28(6), pp. 553–560. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2016.06.01.

Ferreira, A. and Caceres, A. (1991) 'Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(2), pp. 392–400.

Fife, C.M., McCarroll, J.A. and Kavallaris, M. (2014) 'Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis', *British Journal of Pharmacology*, 171(24), pp. 5507–5523. doi:10.1111/bph.12704.

Fishel, M.L., Vasko, M.R. and Kelley, M.R. (2007) 'DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair?', *Mutation Research*, 614(1–2), pp. 24–36. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.06.007.

Flavahan, W.A. *et al.* (2016) 'Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas', *Nature*, 529(7584), pp. 110–114. doi:10.1038/nature16490.

Floyd, R.A. (1990) 'The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis', *Carcinogenesis*, 11(9), pp. 1447–1450. doi:10.1093/carcin/11.9.1447.

Forli, S. (2014) 'Epothilones: From discovery to clinical trials', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(20), pp. 2312–2321. doi:10.2174/1568026614666141130095855.

Fortune, J.M. and Osheroff, N. (2000) 'Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice', *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 64, pp. 221–253. doi:10.1016/s0079-6603(00)64006-0.

Fountzilias, G. *et al.* (2013) 'Ixabepilone administered weekly or every three weeks in HER2-negative metastatic breast cancer patients; a randomized non-comparative phase II trial', *PloS One*, 8(7), p. e69256. doi:10.1371/journal.pone.0069256.

Fradet-Turcotte, A. *et al.* (2013) '53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark', *Nature*, 499(7456), pp. 50–54. doi:10.1038/nature12318.

Frank, S. *et al.* (2001) 'The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis', *Developmental Cell*, 1(4), pp. 515–525. doi:10.1016/s1534-5807(01)00055-7.

Fresno Vara, J.A. *et al.* (2004) 'PI3K/Akt signalling pathway and cancer', *Cancer Treatment Reviews*, 30(2), pp. 193–204. doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.007.

Fridlich, R. *et al.* (2015) 'BRCA1 and BRCA2 protect against oxidative DNA damage converted into double-strand breaks during DNA replication', *DNA repair*, 30, pp. 11–20. doi:10.1016/j.dnarep.2015.03.002.

Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J. and Feany, Mel B. (2014) 'Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation', *Nature Neuroscience*, 17(3), pp. 357–366. doi:10.1038/nn.3639.

Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J. and Feany, Mel B. (2014) 'Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation', *Nature Neuroscience*, 17(3), pp. 357–366. doi:10.1038/nn.3639.

## G

Galas, M.-C. *et al.* (2019) 'Emerging Connections Between Tau and Nucleic Acids', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1184, pp. 135–143. doi:10.1007/978-981-32-9358-8\_12.

Gan, P.P., Pasquier, E. and Kavallaris, M. (2007) 'Class III beta-tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer', *Cancer Research*, 67(19), pp. 9356–9363. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0509.

Gao, F. *et al.* (2018) 'The neurotrophic tyrosine kinase receptor TrkA and its ligand NGF are increased in squamous cell carcinomas of the lung', *Scientific Reports*, 8(1), p. 8135. doi:10.1038/s41598-018-26408-2.

Gargini, R. *et al.* (2020) 'The IDH-TAU-EGFR triad defines the neovascular landscape of diffuse gliomas', *Science Translational Medicine*, 12(527). doi:10.1126/scitranslmed.aax1501.

Gargini, R., Segura-Collar, B. and Sánchez-Gómez, P. (2019) 'Novel Functions of the Neurodegenerative-Related Gene Tau in Cancer', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, p. 231. doi:10.3389/fnagi.2019.00231.

Gehan, E.A. and Freireich, E.J. (2011) 'The 6-MP versus placebo clinical trial in acute leukemia', *Clinical Trials (London, England)*, 8(3), pp. 288–297. doi:10.1177/1740774511407358.

- Giannakakou, P. *et al.* (1997) 'Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization', *The Journal of Biological Chemistry*, 272(27), pp. 17118–17125. doi:10.1074/jbc.272.27.17118.
- Giannakakou, P., Gussio, R., *et al.* (2000) 'A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), pp. 2904–2909. doi:10.1073/pnas.040546297.
- Giannakakou, P., Sackett, D.L., *et al.* (2000) 'p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein', *Nature Cell Biology*, 2(10), pp. 709–717. doi:10.1038/35036335.
- Giannakakou, P. *et al.* (2002) 'Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), pp. 10855–10860. doi:10.1073/pnas.132275599.
- Gigant, B. *et al.* (2005) 'Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine', *Nature*, 435(7041), pp. 519–522. doi:10.1038/nature03566.
- Gil Del Alcazar, C.R. *et al.* (2016) 'Augmented HR Repair Mediates Acquired Temozolomide Resistance in Glioblastoma', *Molecular cancer research: MCR*, 14(10), pp. 928–940. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0125.
- Gille, L. and Nohl, H. (1997) 'Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity', *Free Radical Biology & Medicine*, 23(5), pp. 775–782. doi:10.1016/s0891-5849(97)00025-7.
- Gilman, A. (1963) 'The initial clinical trial of nitrogen mustard', *American Journal of Surgery*, 105, pp. 574–578. doi:10.1016/0002-9610(63)90232-0.
- Gilman, A. and Philips, F.S. (1946) 'The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides', *Science (New York, N.Y.)*, 103(2675), pp. 409–436. doi:10.1126/science.103.2675.409.
- Glaser, K.B. *et al.* (2003) 'Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines', *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(2), pp. 151–163.
- Goedert, M. *et al.* (1988) 'Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(11), pp. 4051–4055. doi:10.1073/pnas.85.11.4051.
- Goedert, M. *et al.* (1989) 'Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease', *Neuron*, 3(4), pp. 519–526. doi:10.1016/0896-6273(89)90210-9.
- Goedert, M. and Jakes, R. (1990) 'Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization', *The EMBO journal*, 9(13), pp. 4225–4230.

Goedert, M., Spillantini, M.G. and Crowther, R.A. (1992) 'Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), pp. 1983–1987. doi:10.1073/pnas.89.5.1983.

Gonzalez-Garay, M.L. *et al.* (1999) 'A beta-tubulin leucine cluster involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34), pp. 23875–23882. doi:10.1074/jbc.274.34.23875.

Greenwood, J.A. and Johnson, G.V. (1995) 'Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau', *Experimental Cell Research*, 220(2), pp. 332–337. doi:10.1006/excr.1995.1323.

Gui, C.-Y. *et al.* (2004) 'Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), pp. 1241–1246. doi:10.1073/pnas.0307708100.

Guirouilh-Barbat, J. *et al.* (2004) 'Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells', *Molecular Cell*, 14(5), pp. 611–623. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.008.

Guirouilh-Barbat, J. *et al.* (2007) 'Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), pp. 20902–20907. doi:10.1073/pnas.0708541104.

Guirouilh-Barbat, J. *et al.* (2014) 'Is homologous recombination really an error-free process?', *Frontiers in Genetics*, 5, p. 175. doi:10.3389/fgene.2014.00175.

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

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

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

Gupta (1995) 'Brachytherapy - Past, Present And Future', *Journal of Medical Physics*, 20(2), p. 31.

## H

Hamann, U. *et al.* (2003) 'Similar contributions of BRCA1 and BRCA2 germline mutations to early-onset breast cancer in Germany', *European journal of human genetics: EJHG*, 11(6), pp. 464–467. doi:10.1038/sj.ejhg.5200988.

Han, Y. *et al.* (2019) 'Mitochondrial fission causes cisplatin resistance under hypoxic conditions via ROS in ovarian cancer cells', *Oncogene*, 38(45), pp. 7089–7105. doi:10.1038/s41388-019-0949-5.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

- Hansen, L.T., Lundin, C., Helleday, T., *et al.* (2003) 'DNA repair rate and etoposide (VP16) resistance of tumor cell subpopulations derived from a single human small cell lung cancer', *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 40(2), pp. 157–164. doi:10.1016/s0169-5002(03)00026-6.
- Hansen, L.T., Lundin, C., Spang-Thomsen, M., *et al.* (2003) 'The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer', *International Journal of Cancer*, 105(4), pp. 472–479. doi:10.1002/ijc.11106.
- Hara, T. *et al.* (2010) 'A mutation in beta-tubulin and a sustained dependence on androgen receptor signalling in a newly established docetaxel-resistant prostate cancer cell line', *Cell Biology International*, 34(2), pp. 177–184. doi:10.1042/CBI20090030.
- He, T. *et al.* (2015) 'PRX1 knockdown potentiates vitamin K3 toxicity in cancer cells: a potential new therapeutic perspective for an old drug', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34(1), p. 152. doi:10.1186/s13046-015-0270-2.
- Her, J. and Bunting, S.F. (2018) 'How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks', *The Journal of Biological Chemistry*, 293(27), pp. 10502–10511. doi:10.1074/jbc.TM118.000371.
- Herman, J.G. and Baylin, S.B. (2003) 'Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation', *The New England Journal of Medicine*, 349(21), pp. 2042–2054. doi:10.1056/NEJMra023075.
- Hervy, J. and Bicout, D.J. (2019) 'Dynamical decoration of stabilized-microtubules by Tau-proteins', *Scientific Reports*, 9(1), p. 12473. doi:10.1038/s41598-019-48790-1.
- Höglinger, G.U. *et al.* (2011) 'Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy', *Nature Genetics*, 43(7), pp. 699–705. doi:10.1038/ng.859.
- Holohan, C. *et al.* (2013) 'Cancer drug resistance: an evolving paradigm', *Nature Reviews. Cancer*, 13(10), pp. 714–726. doi:10.1038/nrc3599.
- Holzer, M. *et al.* (2004) 'Tau gene (MAPT) sequence variation among primates', *Gene*, 341, pp. 313–322. doi:10.1016/j.gene.2004.07.013.
- Hong, M. *et al.* (1998) 'Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17', *Science (New York, N.Y.)*, 282(5395), pp. 1914–1917. doi:10.1126/science.282.5395.1914.
- Housman, G. *et al.* (2014) 'Drug resistance in cancer: an overview', *Cancers*, 6(3), pp. 1769–1792. doi:10.3390/cancers6031769.
- Hu, Y. *et al.* (2016) 'Tau accumulation impairs mitophagy via increasing mitochondrial membrane potential and reducing mitochondrial Parkin', *Oncotarget*, 7(14), pp. 17356–17368. doi:10.18632/oncotarget.7861.
- Hua, Q. *et al.* (2003) 'Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 60(2), pp. 413–421. doi:10.1007/s000180300034.
- Hua, Q. and He, R. (2000) 'Human neuronal tau promoting the melting temperature of DNA'. doi:10.1007/BF02884979.

Hua, Q. and He, R. (2003) 'Tau could protect DNA double helix structure', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1645(2), pp. 205–211. doi:10.1016/s1570-9639(02)00538-1.

Huang, P. *et al.* (2000) 'Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells', *Nature*, 407(6802), pp. 390–395. doi:10.1038/35030140.

Huin, V. *et al.* (2016) 'The MAPT gene is differentially methylated in the progressive supranuclear palsy brain', *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 31(12), pp. 1883–1890. doi:10.1002/mds.26820.

Huin, V. *et al.* (2017) 'Alternative promoter usage generates novel shorter MAPT mRNA transcripts in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy brains', *Scientific Reports*, 7(1), p. 12589. doi:10.1038/s41598-017-12955-7.

Hunniford, C.A. *et al.* (2007) 'Damage to plasmid DNA induced by low energy carbon ions', *Physics in Medicine and Biology*, 52(13), pp. 3729–3740. doi:10.1088/0031-9155/52/13/005.

## I

Iijima-Ando, K. *et al.* (2010) 'A DNA damage-activated checkpoint kinase phosphorylates tau and enhances tau-induced neurodegeneration', *Human Molecular Genetics*, 19(10), pp. 1930–1938. doi:10.1093/hmg/ddq068.

Ikeda, H. *et al.* (2010a) 'The estrogen receptor influences microtubule-associated protein tau (MAPT) expression and the selective estrogen receptor inhibitor fulvestrant downregulates MAPT and increases the sensitivity to taxane in breast cancer cells', *Breast cancer research: BCR*, 12(3), p. R43. doi:10.1186/bcr2598.

Ikeda, H. *et al.* (2010b) 'The estrogen receptor influences microtubule-associated protein tau (MAPT) expression and the selective estrogen receptor inhibitor fulvestrant downregulates MAPT and increases the sensitivity to taxane in breast cancer cells', *Breast cancer research: BCR*, 12(3), p. R43. doi:10.1186/bcr2598.

Inamochi, H. *et al.* (1999) 'Delayed cytotoxicity of 6-mercaptopurine is compatible with mitotic death caused by DNA damage due to incorporation of 6-thioguanine into DNA as 6-thioguanine nucleotide', *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 18(3), pp. 417–424.

Irani, K. *et al.* (1997) 'Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts', *Science (New York, N.Y.)*, 275(5306), pp. 1649–1652. doi:10.1126/science.275.5306.1649.

Iwata, A. *et al.* (2014) 'Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation', *Human Molecular Genetics*, 23(3), pp. 648–656. doi:10.1093/hmg/ddt451.

## J

Jamison, J.M. *et al.* (2001) 'Evaluation of the In Vitro and In Vivo Antitumor Activities of Vitamin C and K-3 Combinations against Human Prostate Cancer', *The Journal of Nutrition*, 131(1), pp. 158S-160S. doi:10.1093/jn/131.1.158S.



Jellinger, K.A. (2006) 'Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research', *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 113(11), pp. 1603–1623. doi:10.1007/s00702-006-0578-3.

Ježek, J., Cooper, K.F. and Strich, R. (2021) 'The Impact of Mitochondrial Fission-Stimulated ROS Production on Pro-Apoptotic Chemotherapy', *Biology*, 10(1), p. 33. doi:10.3390/biology10010033.

Jhappan, C. *et al.* (1997) 'DNA-PKcs: a T-cell tumour suppressor encoded at the mouse scid locus', *Nature Genetics*, 17(4), pp. 483–486. doi:10.1038/ng1297-483.

Jiang, G. *et al.* (2013) 'BRCA1-Ku80 Protein Interaction Enhances End-joining Fidelity of Chromosomal Double-strand Breaks in the G1 Phase of the Cell Cycle', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(13), pp. 8966–8976. doi:10.1074/jbc.M112.412650.

Jin, Y. *et al.* (2016) 'Increasing sensitivity to DNA damage is a potential driver for human ovarian cancer', *Oncotarget*, 7(31), pp. 49710–49721. doi:10.18632/oncotarget.10436.

Johnson, I.S. *et al.* (1960) 'Antitumor Principles Derived from *Vinca rosea* Linn: I. Vincalukoblastine and Leurosine', *Cancer Research*, 20(7 Part 1), pp. 1016–1022.

Jordan, M.A., Thrower, D. and Wilson, L. (1991) 'Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids', *Cancer Research*, 51(8), pp. 2212–2222.

Juvekar, A. *et al.* (2016) 'Phosphoinositide 3-kinase inhibitors induce DNA damage through nucleoside depletion', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(30), pp. E4338–4347. doi:10.1073/pnas.1522223113.

## K

Kadavath, H., Jaremko, M., *et al.* (2015) 'Folding of the Tau Protein on Microtubules', *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 54(35), pp. 10347–10351. doi:10.1002/anie.201501714.

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

Kahlert, C. *et al.* (2014) 'Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer', *The Journal of Biological Chemistry*, 289(7), pp. 3869–3875. doi:10.1074/jbc.C113.532267.

Kalinski, A.L. *et al.* (2019) 'Deacetylation of Miro1 by HDAC6 blocks mitochondrial transport and mediates axon growth inhibition', *The Journal of Cell Biology*, 218(6), pp. 1871–1890. doi:10.1083/jcb.201702187.

Kalivendi, S.V. *et al.* (2001) 'Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp. 47266–47276. doi:10.1074/jbc.M106829200.

Kalluri, R. (2016) 'The biology and function of exosomes in cancer', *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), pp. 1208–1215. doi:10.1172/JCI81135.

- Kanai, Y. *et al.* (1989) 'Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA', *The Journal of Cell Biology*, 109(3), pp. 1173–1184. doi:10.1083/jcb.109.3.1173.
- Kandimalla, R., Thirumala, V. and Reddy, P.H. (2017) 'Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal', *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1863(5), pp. 1078–1089. doi:10.1016/j.bbadis.2016.08.018.
- Kansanen, E. *et al.* (2013) 'The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer', *Redox Biology*, 1, pp. 45–49. doi:10.1016/j.redox.2012.10.001.
- Kar, S. *et al.* (2003) 'Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol', *The EMBO journal*, 22(1), pp. 70–77. doi:10.1093/emboj/cdg001.
- Karahalil, B., Yardım-Akaydin, S. and Nacak Baytas, S. (2019) 'An overview of microtubule targeting agents for cancer therapy', *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 70(3), pp. 160–172. doi:10.2478/aiht-2019-70-3258.
- Kauffmann-Zeh, A. *et al.* (1997) 'Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB', *Nature*, 385(6616), pp. 544–548. doi:10.1038/385544a0.
- Kavallaris, M. *et al.* (1997) 'Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isoforms', *The Journal of Clinical Investigation*, 100(5), pp. 1282–1293. doi:10.1172/JCI119642.
- Kennedy, D.R. and Beerman, T.A. (2006) 'The radiomimetic enediyne C-1027 induces unusual DNA damage responses to double-strand breaks', *Biochemistry*, 45(11), pp. 3747–3754. doi:10.1021/bi052334c.
- Kernbaum, M. (1909) 'Sur la décomposition de l'eau par les rayons  $\beta$  du radium et par les rayons ultra-violet', *Le Radium*, 6(8), pp. 225–228. doi:10.1051/radium:0190900608022500.
- Khaleghi, S. *et al.* (2017) 'Anti-HER2 VHH Targeted Magnetoliposome for Intelligent Magnetic Resonance Imaging of Breast Cancer Cells', *Cellular and Molecular Bioengineering*, 10(3), pp. 263–272. doi:10.1007/s12195-017-0481-z.
- Khongkow, M. *et al.* (2013) 'SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer', *Carcinogenesis*, 34(7), pp. 1476–1486. doi:10.1093/carcin/bgt098.
- Khongkow, P. *et al.* (2014) 'FOXO1 targets NBS1 to regulate DNA damage-induced senescence and epirubicin resistance', *Oncogene*, 33(32), pp. 4144–4155. doi:10.1038/ncr.2013.457.
- Kim, D.H. *et al.* (2019) 'Enhanced anticancer effects of a methylation inhibitor by inhibiting a novel DNMT1 target, CEP 131, in cervical cancer', *BMB reports*, 52(5), pp. 342–347.
- Kim, M.S. *et al.* (2003) 'Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA', *Cancer Research*, 63(21), pp. 7291–7300.
- Kim, W. *et al.* (2010) 'Interneuronal transfer of human tau between Lamprey central neurons in situ', *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 19(2), pp. 647–664. doi:10.3233/JAD-2010-1273.

Klar, U., Hoffmann, J. and Giurescu, M. (2008) 'Sagopilone (ZK-EPO): from a natural product to a fully synthetic clinical development candidate', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(11), pp. 1735–1748. doi:10.1517/13543784.17.11.1735.

Klein, H.-U. *et al.* (2019) 'Epigenome-wide study uncovers large-scale changes in histone acetylation driven by tau pathology in aging and Alzheimer's human brains', *Nature Neuroscience*, 22(1), pp. 37–46. doi:10.1038/s41593-018-0291-1.

Knops, J. *et al.* (1991) 'Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes.', *Journal of Cell Biology*, 114(4), pp. 725–733. doi:10.1083/jcb.114.4.725.

Komlodi-Pasztor, E. *et al.* (2011) 'Mitosis is not a key target of microtubule agents in patient tumors', *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 8(4), pp. 244–250. doi:10.1038/nrclinonc.2010.228.

Kondo, N. *et al.* (2009) 'DNA ligase IV as a new molecular target for temozolomide', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(4), pp. 656–660. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.045.

Koźmiński, P. *et al.* (2020) 'Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), p. E3483. doi:10.3390/ijms21103483.

Kramer, K.M. *et al.* (1994) 'Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar RAD52-independent, nonhomologous recombination events', *Molecular and Cellular Biology*, 14(2), pp. 1293–1301. doi:10.1128/mcb.14.2.1293-1301.1994.

Krusche, C.A. *et al.* (2005) 'Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis', *Breast Cancer Research and Treatment*, 90(1), pp. 15–23. doi:10.1007/s10549-004-1668-2.

Kurihara, M. *et al.* (2019) 'Colocalization of BRCA1 with Tau Aggregates in Human Tauopathies', *Brain Sciences*, 10(1), p. E7. doi:10.3390/brainsci10010007.

Kurz, E.U. *et al.* (2001) 'The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces DNA topoisomerase II alpha expression and confers hypersensitivity to etoposide in human leukemic cell lines', *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(2), pp. 121–131.

Kweon, M.-H. *et al.* (2006) 'Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(44), pp. 33761–33772. doi:10.1074/jbc.M604748200.

## L

Lacombe, S., Le Sech, C. and Esaulov, V.A. (2004) 'DNA strand breaks induced by low keV energy heavy ions', *Physics in Medicine and Biology*, 49(6), pp. N65-73. doi:10.1088/0031-9155/49/6/n02.

Larsen, A.K., Escargueil, A.E. and Skladanowski, A. (2003) 'Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy', *Pharmacology & Therapeutics*, 99(2), pp. 167–181. doi:10.1016/s0163-7258(03)00058-5.

Leach, J.K. *et al.* (2001) 'Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen', *Cancer Research*, 61(10), pp. 3894–3901.

- Lebouvier, T., Pasquier, F. and Buée, L. (2017) 'Update on tauopathies', *Current Opinion in Neurology*, 30(6), pp. 589–598. doi:10.1097/WCO.0000000000000502.
- Lee, F.Y. *et al.* (2001) 'BMS-247550: a novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor efficacy', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(5), pp. 1429–1437.
- Lee, G., Neve, R.L. and Kosik, K.S. (1989) 'The microtubule binding domain of tau protein', *Neuron*, 2(6), pp. 1615–1624. doi:10.1016/0896-6273(89)90050-0.
- Lee, G. and Rook, S.L. (1992) 'Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization', *Journal of Cell Science*, 102 ( Pt 2), pp. 227–237.
- Lee, H.-C. *et al.* (2004) 'Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line', *International Journal of Molecular Medicine*, 13(6), pp. 883–887.
- Lee, J.-H. *et al.* (2011) 'Role of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), pp. 19629–19634. doi:10.1073/pnas.1117544108.
- Lee, J.H. *et al.* (2013) 'DNA damage-specific control of cell death by cryptochrome in p53-mutant ras-transformed cells', *Cancer Research*, 73(2), pp. 785–791. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1994.
- van der Lee, R. *et al.* (2014) 'Classification of intrinsically disordered regions and proteins', *Chemical Reviews*, 114(13), pp. 6589–6631. doi:10.1021/cr400525m.
- Lee, S.-H. *et al.* (2016) 'Antibody-Mediated Targeting of Tau In Vivo Does Not Require Effector Function and Microglial Engagement', *Cell Reports*, 16(6), pp. 1690–1700. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.099.
- Lee, Y.-H. *et al.* (2013) 'HP1 promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the DNA damage response', *Nucleic Acids Research*, 41(11), pp. 5784–5798. doi:10.1093/nar/gkt231.
- Leugers, C.J. and Lee, G. (2010) 'Tau potentiates nerve growth factor-induced mitogen-activated protein kinase signaling and neurite initiation without a requirement for microtubule binding', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(25), pp. 19125–19134. doi:10.1074/jbc.M110.105387.
- Li, Q. and Martinez, J.D. (2011) 'P53 is Transported Into the Nucleus Via an Hsf1-Dependent Nuclear Localization Mechanism', *Molecular carcinogenesis*, 50(2), pp. 143–152. doi:10.1002/mc.20713.
- Li, X.-C. *et al.* (2016) 'Human wild-type full-length tau accumulation disrupts mitochondrial dynamics and the functions via increasing mitofusins', *Scientific Reports*, 6, p. 24756. doi:10.1038/srep24756.
- Li, Y.-H. *et al.* (2012) 'Inhibition of non-homologous end joining repair impairs pancreatic cancer growth and enhances radiation response', *PLoS One*, 7(6), p. e39588. doi:10.1371/journal.pone.0039588.
- Liao, P.-C., Tandarich, L.C. and Hollenbeck, P.J. (2017) 'ROS regulation of axonal mitochondrial transport is mediated by Ca<sup>2+</sup> and JNK in Drosophila', *PLoS One*, 12(5), p. e0178105. doi:10.1371/journal.pone.0178105.
- Lieber, M.R. (2010) 'The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway', *Annual Review of Biochemistry*, 79, pp. 181–211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131.

- Lillenes, M.S. *et al.* (2016) 'Altered DNA base excision repair profile in brain tissue and blood in Alzheimer's disease', *Molecular Brain*, 9(1), p. 61. doi:10.1186/s13041-016-0237-z.
- Lin, Y., Lukacsovich, T. and Waldman, A.S. (1999) 'Multiple pathways for repair of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes', *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), pp. 8353–8360. doi:10.1128/MCB.19.12.8353.
- Liou, G.-Y. and Storz, P. (2010) 'Reactive oxygen species in cancer', *Free radical research*, 44(5), p. 10.3109/10715761003667554. doi:10.3109/10715761003667554.
- Liu, C. and Götz, J. (2013) 'Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus', *PLoS One*, 8(12), p. e84849. doi:10.1371/journal.pone.0084849.
- Liu, C.W., Lee, G. and Jay, D.G. (1999) 'Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 43(3), pp. 232–242. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1999)43:3<232::AID-CM6>3.0.CO;2-7.
- Liu, J.S. *et al.* (2001) 'DNA damage by the enediyne C-1027 results in the inhibition of DNA replication by loss of replication protein A function and activation of DNA-dependent protein kinase', *Biochemistry*, 40(48), pp. 14661–14668. doi:10.1021/bi015680c.
- Liu, L.-Z. *et al.* (2006) 'Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells', *Free Radical Biology & Medicine*, 41(10), pp. 1521–1533. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.003.
- Lo, K.W.-H. *et al.* (2005) 'The 8-kDa dynein light chain binds to p53-binding protein 1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), pp. 8172–8179. doi:10.1074/jbc.M411408200.
- Loehrer, P.J. *et al.* (1988) 'Salvage therapy in recurrent germ cell cancer: ifosfamide and cisplatin plus either vinblastine or etoposide', *Annals of Internal Medicine*, 109(7), pp. 540–546. doi:10.7326/0003-4819-109-7-540.
- Loman, N. *et al.* (2001) 'Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer', *Journal of the National Cancer Institute*, 93(16), pp. 1215–1223. doi:10.1093/jnci/93.16.1215.
- Loomis, P.A. *et al.* (1990) 'Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), pp. 8422–8426. doi:10.1073/pnas.87.21.8422.
- Lotterberger, F. *et al.* (2015) '53BP1 and the LINC Complex Promote Microtubule-Dependent DSB Mobility and DNA Repair', *Cell*, 163(4), pp. 880–893. doi:10.1016/j.cell.2015.09.057.
- Lou, M. *et al.* (2021) 'Aberrant methylation of GADD45A is associated with decreased radiosensitivity in cervical cancer through the PI3K/AKT signaling pathway', *Oncology Letters*, 21(1), p. 8. doi:10.3892/ol.2020.12269.
- Lu, T. (2017) 'Modeling Space Radiation with Radiomimetic Agent Bleomycin', 23 January. Available at: <https://ntrs.nasa.gov/citations/20170001363> (Accessed: 12 August 2021).

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

Lukas, C. *et al.* (2011) '53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress', *Nature Cell Biology*, 13(3), pp. 243–253. doi:10.1038/ncb2201.

Luo, M.-H., Leski, M.L. and Andreadis, A. (2004) 'Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation', *Journal of Cellular Biochemistry*, 91(5), pp. 880–895. doi:10.1002/jcb.20029.

Luperchio, S., Tamir, S. and Tannenbaum, S.R. (1996) 'NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells', *Free Radical Biology & Medicine*, 21(4), pp. 513–519. doi:10.1016/0891-5849(96)00219-5.

Lv, Z. *et al.* (2016) 'Downregulation of HDAC6 promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma cells and predicts poor prognosis in liver transplantation patients', *Molecular Carcinogenesis*, 55(5), pp. 1024–1033. doi:10.1002/mc.22345.

## M

Ma, S. *et al.* (2021) 'DNA damage promotes microtubule dynamics through a DNA-PK-AKT axis for enhanced repair', *The Journal of Cell Biology*, 220(2), p. e201911025. doi:10.1083/jcb.201911025.

Ma, Y. *et al.* (2002) 'Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination', *Cell*, 108(6), pp. 781–794. doi:10.1016/s0092-8674(02)00671-2.

Ma, Y. *et al.* (2004) 'A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining', *Molecular Cell*, 16(5), pp. 701–713. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.017.

Ma, Y., Wang, L. and Jia, R. (2020) 'The role of mitochondrial dynamics in human cancers', *American Journal of Cancer Research*, 10(5), pp. 1278–1293.

Macaskill, A.F. *et al.* (2009) 'Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses', *Neuron*, 61(4), pp. 541–555. doi:10.1016/j.neuron.2009.01.030.

Machado-Neto, J.A., Saad, S.T.O. and Traina, F. (2014) 'Stathmin 1 in normal and malignant hematopoiesis', *BMB reports*, 47(12), pp. 660–665. doi:10.5483/bmbrep.2014.47.12.020.

Madaan, K., Kaushik, D. and Verma, T. (2012) 'Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy', *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12(1), pp. 19–29. doi:10.1586/era.11.175.

Magnani, M. *et al.* (2006) 'The beta1/betaIII-tubulin isoforms and their complexes with antimetabolic agents. Docking and molecular dynamics studies', *The FEBS journal*, 273(14), pp. 3301–3310. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05340.x.

Malone, K.E. *et al.* (2000) 'Frequency of BRCA1/BRCA2 mutations in a population-based sample of young breast carcinoma cases', *Cancer*, 88(6), pp. 1393–1402. doi:10.1002/(sici)1097-0142(20000315)88:6<1393::aid-cnrcr17>3.0.co;2-p.

- Malu, S. *et al.* (2012) 'Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination', *Immunologic Research*, 54(1–3), pp. 233–246. doi:10.1007/s12026-012-8329-z.
- Mamun, A.A. *et al.* (2020) 'Toxic tau: structural origins of tau aggregation in Alzheimer's disease', *Neural Regeneration Research*, 15(8), pp. 1417–1420. doi:10.4103/1673-5374.274329.
- Mandelkow, E.-M. and Mandelkow, E. (2012) 'Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), p. a006247. doi:10.1101/cshperspect.a006247.
- Mansoori, B. *et al.* (2017) 'The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review', *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3), pp. 339–348. doi:10.15171/apb.2017.041.
- Mansuroglu, Z. *et al.* (2016a) 'Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin', *Scientific Reports*, 6(1), p. 33047. doi:10.1038/srep33047.
- Mansuroglu, Z. *et al.* (2016b) 'Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin', *Scientific Reports*, 6, p. 33047. doi:10.1038/srep33047.
- Mao, Q. *et al.* (2018) 'Prognostic Role of High Stathmin 1 Expression in Patients with Solid Tumors: Evidence from a Meta-Analysis', *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 50(1), pp. 66–78. doi:10.1159/000493958.
- Mao, Z. *et al.* (2008a) 'Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells', *DNA repair*, 7(10), pp. 1765–1771. doi:10.1016/j.dnarep.2008.06.018.
- Mao, Z. *et al.* (2008b) 'DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(18), pp. 2902–2906. doi:10.4161/cc.7.18.6679.
- Mao, Z. *et al.* (2009) 'DNA repair by homologous recombination, but not by nonhomologous end joining, is elevated in breast cancer cells', *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11(7), pp. 683–691. doi:10.1593/neo.09312.
- Marchetti, C. *et al.* (2010) 'First-line treatment of advanced ovarian cancer: current research and perspectives', *Expert Review of Anticancer Therapy*, 10(1), pp. 47–60. doi:10.1586/era.09.167.
- Marchi, S. *et al.* (2018) 'Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death', *Cell Calcium*, 69, pp. 62–72. doi:10.1016/j.ceca.2017.05.003.
- Marchion, D.C. *et al.* (2005) 'In vivo synergy between topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors: predictive correlates', *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(12), pp. 1993–2000. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0194.
- Marciniak, E. *et al.* (2017) 'Tau deletion promotes brain insulin resistance', *The Journal of Experimental Medicine*, 214(8), pp. 2257–2269. doi:10.1084/jem.20161731.
- Margison, G.P. and Santibáñez-Koref, M.F. (2002) 'O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy', *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(3), pp. 255–266. doi:10.1002/bies.10063.

- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.-L., Yardin, C., *et al.* (2013) 'Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease', *Ageing Research Reviews*, 12(1), pp. 289–309. doi:10.1016/j.arr.2012.06.003.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.-L. and Terro, F. (2013) 'Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A', *Ageing Research Reviews*, 12(1), pp. 39–49. doi:10.1016/j.arr.2012.06.008.
- Martin, L., Latypova, X. and Terro, F. (2011) 'Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease', *Neurochemistry International*, 58(4), pp. 458–471. doi:10.1016/j.neuint.2010.12.023.
- Martinho, M. *et al.* (2018) 'Two Tau binding sites on tubulin revealed by thiol-disulfide exchanges', *Scientific Reports*, 8(1), p. 13846. doi:10.1038/s41598-018-32096-9.
- Martino, E. *et al.* (2018) 'Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(17), pp. 2816–2826. doi:10.1016/j.bmcl.2018.06.044.
- Mason, K.A. *et al.* (1997) 'Docetaxel enhances tumor radioresponse in vivo', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 3(12 Pt 1), pp. 2431–2438.
- Matrone, M.A. *et al.* (2010) 'Metastatic breast tumors express increased tau, which promotes microtentacle formation and the reattachment of detached breast tumor cells', *Oncogene*, 29(22), pp. 3217–3227. doi:10.1038/onc.2010.68.
- Maybaum, J. *et al.* (1980) 'Regulation of RNA- and DNA-directed actions of 5-fluoropyrimidines in mouse T-lymphoma (S-49) cells', *Cancer Research*, 40(11), pp. 4209–4215.
- McCann, J.V. *et al.* (2019) 'Endothelial miR-30c suppresses tumor growth via inhibition of TGF- $\beta$ -induced Serpine1', *The Journal of Clinical Investigation*, 129(4), pp. 1654–1670. doi:10.1172/JCI123106.
- McCormick, B. *et al.* (2016) 'MitoVitE, a mitochondria-targeted antioxidant, limits paclitaxel-induced oxidative stress and mitochondrial damage in vitro, and paclitaxel-induced mechanical hypersensitivity in a rat pain model', *British Journal of Anaesthesia*, 117(5), pp. 659–666. doi:10.1093/bja/aew309.
- McVey, M. *et al.* (2016) 'Eukaryotic DNA Polymerases in Homologous Recombination', *Annual Review of Genetics*, 50, pp. 393–421. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035243.
- Mecocci, P., MacGarvey, U. and Beal, M.F. (1994) 'Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease', *Annals of Neurology*, 36(5), pp. 747–751. doi:10.1002/ana.410360510.
- Megerdichian, C., Olimpiadi, Y. and Hurvitz, S.A. (2014) 'nab-Paclitaxel in combination with biologically targeted agents for early and metastatic breast cancer', *Cancer Treatment Reviews*, 40(5), pp. 614–625. doi:10.1016/j.ctrv.2014.02.001.
- Melkov, A. and Abdu, U. (2018) 'Regulation of long-distance transport of mitochondria along microtubules', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 75(2), pp. 163–176. doi:10.1007/s00018-017-2590-1.



- Mena, R. *et al.* (1996) 'Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica*, 91(6), pp. 633–641. doi:10.1007/s004010050477.
- Meng, X. *et al.* (2015) 'Novel role for non-homologous end joining in the formation of double minutes in methotrexate-resistant colon cancer cells', *Journal of Medical Genetics*, 52(2), pp. 135–144. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102703.
- Meshkini, A. and Yazdanparast, R. (2012) 'Involvement of oxidative stress in taxol-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells', *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 64(4), pp. 357–365. doi:10.1016/j.etp.2010.09.010.
- Milas, L. *et al.* (1995) 'Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 35(4), pp. 297–303. doi:10.1007/BF00689448.
- Milella, M. *et al.* (2015) 'PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors', *Frontiers in Oncology*, 5. doi:10.3389/fonc.2015.00024.
- Mimori, K. *et al.* (2006) 'Reduced tau expression in gastric cancer can identify candidates for successful Paclitaxel treatment', *British Journal of Cancer*, 94(12), pp. 1894–1897. doi:10.1038/sj.bjc.6603182.
- Minamiya, Y. *et al.* (2011) 'Expression of histone deacetylase 1 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung', *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 74(2), pp. 300–304. doi:10.1016/j.lungcan.2011.02.019.
- Mitchison, T.J. (2012) 'The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy', *Molecular Biology of the Cell*, 23(1), pp. 1–6. doi:10.1091/mbc.E10-04-0335.
- Mitsiades, C.S. *et al.* (2004) 'Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), pp. 540–545. doi:10.1073/pnas.2536759100.
- Molinari, F. and Frattini, M. (2013) 'Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer', *Frontiers in Oncology*, 3, p. 326. doi:10.3389/fonc.2013.00326.
- Monzó, M. *et al.* (1999) 'Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(6), pp. 1786–1793. doi:10.1200/JCO.1999.17.6.1786.
- Moorhead, P.S. and Heyman, A. (1983) 'Chromosome studies of patients with Alzheimer disease', *American Journal of Medical Genetics*, 14(3), pp. 545–556. doi:10.1002/ajmg.1320140319.
- von Morgen, P. *et al.* (2018) 'Nuclear localisation of 53BP1 is regulated by phosphorylation of the nuclear localisation signal', *Biology of the Cell*, 110(6), pp. 137–146. doi:10.1111/boc.201700067.
- Morrison, D.K. (2012) 'MAP Kinase Pathways', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11). doi:10.1101/cshperspect.a011254.
- Moudry, P. *et al.* (2012a) 'Nucleoporin NUP153 guards genome integrity by promoting nuclear import of 53BP1', *Cell Death and Differentiation*, 19(5), pp. 798–807. doi:10.1038/cdd.2011.150.

Moudry, P. *et al.* (2012b) 'Nucleoporin NUP153 guards genome integrity by promoting nuclear import of 53BP1', *Cell Death and Differentiation*, 19(5), pp. 798–807. doi:10.1038/cdd.2011.150.

Mukrasch, M.D. *et al.* (2009) 'Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution', *PLoS biology*, 7(2), p. e34. doi:10.1371/journal.pbio.1000034.

Mullee, L.I. and Morrison, C.G. (2016) 'Centrosomes in the DNA damage response--the hub outside the centre', *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 24(1), pp. 35–51. doi:10.1007/s10577-015-9503-7.

Muñoz, J.P. *et al.* (2013) 'Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK', *The EMBO journal*, 32(17), pp. 2348–2361. doi:10.1038/emboj.2013.168.

Murr, R. *et al.* (2006) 'Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks', *Nature Cell Biology*, 8(1), pp. 91–99. doi:10.1038/ncb1343.

Muvarak, N. *et al.* (2015) 'c-MYC Generates Repair Errors via Increased Transcription of Alternative-NHEJ Factors, LIG3 and PARP1, in Tyrosine Kinase-Activated Leukemias', *Molecular cancer research: MCR*, 13(4), pp. 699–712. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0422.

Mylonas, E. *et al.* (2008) 'Domain conformation of tau protein studied by solution small-angle X-ray scattering', *Biochemistry*, 47(39), pp. 10345–10353. doi:10.1021/bi800900d.

## N

Nair, N., Shoib, M. and Sørensen, C.S. (2017) 'Chromatin Dynamics in Genome Stability: Roles in Suppressing Endogenous DNA Damage and Facilitating DNA Repair', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), p. 1486. doi:10.3390/ijms18071486.

Nakamura, M. *et al.* (2020) 'Aberrant Accumulation of BRCA1 in Alzheimer Disease and Other Tauopathies', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 79(1), pp. 22–33. doi:10.1093/jnen/nlz107.

Neve, R.L. *et al.* (1986) 'Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2', *Brain Research*, 387(3), pp. 271–280. doi:10.1016/0169-328x(86)90033-1.

Newman, E.A. *et al.* (2015) 'Alternative NHEJ Pathway Components Are Therapeutic Targets in High-Risk Neuroblastoma', *Molecular cancer research: MCR*, 13(3), pp. 470–482. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0337.

Ngan, V.K. *et al.* (2001) 'Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic Vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine', *Molecular Pharmacology*, 60(1), pp. 225–232. doi:10.1124/mol.60.1.225.

Nguyen, T.T. *et al.* (2014) 'Loss of Miro1-directed mitochondrial movement results in a novel murine model for neuron disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), pp. E3631-3640. doi:10.1073/pnas.1402449111.

Nichols, J.B. *et al.* (2021) 'Vascular Lesions, APOE ε4, and Tau Pathology in Alzheimer Disease', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 80(3), pp. 240–246. doi:10.1093/jnen/nlaa160.

Nicolaou, K.C., Roschangar, F. and Vourloumis, D. (1998) 'Chemical Biology of Epothilones', *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 37(15), pp. 2014–2045. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19980817)37:15<2014::AID-ANIE2014>3.0.CO;2-2.

Noble, R.L., Beer, C.T. and Cutts, J.H. (1958) 'Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 76(3), pp. 882–894. doi:10.1111/j.1749-6632.1958.tb54906.x.

Noble, W. *et al.* (2013) 'The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases', *Frontiers in Neurology*, 4, p. 83. doi:10.3389/fneur.2013.00083.

Nogales, E., Wolf, S.G. and Downing, K.H. (1998) 'Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography', *Nature*, 391(6663), pp. 199–203. doi:10.1038/34465.

Novák, M. (1994) 'Truncated tau protein as a new marker for Alzheimer's disease', *Acta Virologica*, 38(3), pp. 173–189.

Nunez, J. and Fischer, I. (1997) 'Microtubule-associated proteins (MAPs) in the peripheral nervous system during development and regeneration', *Journal of molecular neuroscience: MN*, 8(3), pp. 207–222. doi:10.1007/BF02736834.

## O

Ott, M. *et al.* (2007) 'Mitochondria, oxidative stress and cell death', *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 12(5), pp. 913–922. doi:10.1007/s10495-007-0756-2.

## P

Pallis, A.G. *et al.* (2012) 'A multicenter randomized phase III trial of vinorelbine/gemcitabine doublet versus capecitabine monotherapy in anthracycline- and taxane-pretreated women with metastatic breast cancer', *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 23(5), pp. 1164–1169. doi:10.1093/annonc/mdr405.

Pang, X.-L. *et al.* (2013) 'Endoplasmic reticulum stress sensitizes human esophageal cancer cell to radiation', *World Journal of Gastroenterology*, 19(11), pp. 1736–1748. doi:10.3748/wjg.v19.i11.1736.

Park, H.-K. *et al.* (2019) 'Interplay between TRAP1 and Sirtuin-3 Modulates Mitochondrial Respiration and Oxidative Stress to Maintain Stemness of Glioma Stem Cells', *Cancer Research*, 79(7), pp. 1369–1382. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2558.

Patel, R.B. *et al.* (2011) 'Pulmonary fibrosis inducer, bleomycin, causes redox-sensitive activation of phospholipase D and cytotoxicity through formation of bioactive lipid signal mediator, phosphatidic acid, in lung microvascular endothelial cells', *International Journal of Toxicology*, 30(1), pp. 69–90. doi:10.1177/1091581810388850.

Pearce, L.L. *et al.* (2001) 'Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide', *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 5(2), pp. 128–136. doi:10.1006/niox.2001.0338.

Peng, T.-I. and Jou, M.-J. (2010) 'Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201, pp. 183–188. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x.

Pentheroudakis, G. *et al.* (2009) 'Gene expression of estrogen receptor, progesterone receptor and microtubule-associated protein Tau in high-risk early breast cancer: a quest for molecular predictors of treatment benefit in the context of a Hellenic Cooperative Oncology Group trial', *Breast Cancer Research and Treatment*, 116(1), pp. 131–143. doi:10.1007/s10549-008-0144-9.

Perea, J.R., Ávila, J. and Bolós, M. (2018) 'Dephosphorylated rather than hyperphosphorylated Tau triggers a pro-inflammatory profile in microglia through the p38 MAPK pathway', *Experimental Neurology*, 310, pp. 14–21. doi:10.1016/j.expneurol.2018.08.007.

Perez, M. *et al.* (2009) 'Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function', *Journal of Neurochemistry*, 109(6), pp. 1756–1766. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06102.x.

Perillo, B. *et al.* (2008) 'DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression', *Science (New York, N.Y.)*, 319(5860), pp. 202–206. doi:10.1126/science.1147674.

Peruzzi, F. *et al.* (1999) 'Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis', *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), pp. 7203–7215. doi:10.1128/MCB.19.10.7203.

Pommier, Y. *et al.* (2010) 'DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs', *Chemistry & Biology*, 17(5), pp. 421–433. doi:10.1016/j.chembiol.2010.04.012.

Poorkaj, P. *et al.* (2001) 'A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau', *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 12(9), pp. 700–712. doi:10.1007/s00335-001-2044-8.

Poruchynsky, M.S. *et al.* (2015) 'Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5), pp. 1571–1576. doi:10.1073/pnas.1416418112.

Pourrajab, F. *et al.* (2020) 'Molecular Targeting and Rational Chemotherapy in Acute Myeloid Leukemia', *Journal of Experimental Pharmacology*, 12, pp. 107–128. doi:10.2147/JEP.S254334.

Presant, C.A. and Klahr, C. (1978) 'Adriamycin, 1,3-bis (2-chloroethyl) 1 nitrosourea (BCNU, NSC No. 409962), cyclophosphamide plus prednisone (ABC-P) in melphalanresistant multiple myeloma', *Cancer*, 42(3), pp. 1222–1227. doi:10.1002/1097-0142(197809)42:3<1222::aid-cnrcr2820420329>3.0.co;2-k.

Price, C.C. *et al.* (1968) 'Relative reactivities for monofunctional nitrogen mustard alkylation of nucleic acid components', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 166(2), pp. 327–359. doi:10.1016/0005-2787(68)90222-0.

## Q

Qi, M. *et al.* (2020) 'AIM2 promotes the development of non-small cell lung cancer by modulating mitochondrial dynamics', *Oncogene*, 39(13), pp. 2707–2723. doi:10.1038/s41388-020-1176-9.

Quiros, S., Roos, W.P. and Kaina, B. (2010) 'Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(1), pp. 168–178. doi:10.4161/cc.9.1.10363.

## R

Rathore, R. *et al.* (2008) 'Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells', *Free Radical Biology & Medicine*, 45(9), pp. 1223–1231. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.012.

Reddy, K.B. and Glaros, S. (2007) 'Inhibition of the MAP kinase activity suppresses estrogen-induced breast tumor growth both in vitro and in vivo', *International Journal of Oncology*, 30(4), pp. 971–975.

Ren, X. *et al.* (2018) 'Paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis through regulation of ROS and the AKT/MAPK signaling pathway in canine mammary gland tumor cells', *Molecular Medicine Reports*, 17(6), pp. 8289–8299. doi:10.3892/mmr.2018.8868.

Retamales-Ortega, R. *et al.* (2017) 'Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). doi:10.3390/ijms18030507.

Rivkin, S.E. *et al.* (1989) 'Adjuvant CMFVP versus melphalan for operable breast cancer with positive axillary nodes: 10-year results of a Southwest Oncology Group Study', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 7(9), pp. 1229–1238. doi:10.1200/JCO.1989.7.9.1229.

Rogakou, E.P. *et al.* (1999) 'Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo', *The Journal of Cell Biology*, 146(5), pp. 905–916. doi:10.1083/jcb.146.5.905.

Roos, W.P. *et al.* (2009) 'Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs', *DNA repair*, 8(1), pp. 72–86. doi:10.1016/j.dnarep.2008.09.003.

Rosato, R.R. *et al.* (2008) 'Role of histone deacetylase inhibitor-induced reactive oxygen species and DNA damage in LAQ-824/fludarabine antileukemic interactions', *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(10), pp. 3285–3297. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0385.

Rossi, G. *et al.* (2008) 'A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(12), pp. 1788–1794. doi:10.4161/cc.7.12.6012.

Rossi, G. *et al.* (2013) 'Mutations in MAPT gene cause chromosome instability and introduce copy number variations widely in the genome', *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 33(4), pp. 969–982. doi:10.3233/JAD-2012-121633.

Rossi, G. *et al.* (2018) 'Tau Mutations Serve as a Novel Risk Factor for Cancer', *Cancer Research*, 78(13), pp. 3731–3739. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3175.

Rössig, L. *et al.* (2001) 'Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells', *Molecular and Cellular Biology*, 21(16), pp. 5644–5657. doi:10.1128/MCB.21.16.5644-5657.2001.

Rouzier, R. *et al.* (2005) 'Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), pp. 8315–8320. doi:10.1073/pnas.0408974102.

Rowinsky, E. (2003) 'The Taxanes', *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition* [Preprint]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13728/> (Accessed: 3 September 2021).

Rugo, R.E. and Schiestl, R.H. (2004) 'Increases in oxidative stress in the progeny of X-irradiated cells', *Radiation Research*, 162(4), pp. 416–425. doi:10.1667/rr3238.

Ruiz-Saenz, A. *et al.* (2018) 'HER2 Amplification in Tumors Activates PI3K/Akt Signaling Independent of HER3', *Cancer Research*, 78(13), pp. 3645–3658. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0430.

## S

Sadot, E. *et al.* (1996) 'Identification of a tau promoter region mediating tissue-specific-regulated expression in PC12 cells', *Journal of Molecular Biology*, 256(5), pp. 805–812. doi:10.1006/jmbi.1996.0126.

Sakai, W. *et al.* (2008) 'Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers', *Nature*, 451(7182), pp. 1116–1120. doi:10.1038/nature06633.

Saman, Sudad *et al.* (2012) 'Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(6), pp. 3842–3849. doi:10.1074/jbc.M111.277061.

Sankaranarayanan, S. *et al.* (2015) 'Passive immunization with phospho-tau antibodies reduces tau pathology and functional deficits in two distinct mouse tauopathy models', *PloS One*, 10(5), p. e0125614. doi:10.1371/journal.pone.0125614.

Santarella, R.A. *et al.* (2004) 'Surface-decoration of microtubules by human tau', *Journal of Molecular Biology*, 339(3), pp. 539–553. doi:10.1016/j.jmb.2004.04.008.

Schiff, P.B., Fant, J. and Horwitz, S.B. (1979) 'Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol', *Nature*, 277(5698), pp. 665–667. doi:10.1038/277665a0.

Schiff, P.B. and Horwitz, S.B. (1980) 'Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(3), pp. 1561–1565. doi:10.1073/pnas.77.3.1561.

Schmitz, K.R. *et al.* (2013) 'Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains', *Structure (London, England: 1993)*, 21(7), pp. 1214–1224. doi:10.1016/j.str.2013.05.008.

Schnapp, B.J. and Reese, T.S. (1989) 'Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), pp. 1548–1552. doi:10.1073/pnas.86.5.1548.

Scholes, G., Stein, G. and Weiss, J. (1949) 'Action of X-rays on nucleic acids', *Nature*, 164(4173), p. 709. doi:10.1038/164709a0.

Schroeder, C. *et al.* (2019) 'Aberrant expression of the microtubule-associated protein tau is an independent prognostic feature in prostate cancer', *BMC cancer*, 19(1), p. 193. doi:10.1186/s12885-019-5390-1.

Schweers, O. *et al.* (1994) 'Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(39), pp. 24290–24297.

Seluanov, A., Mao, Z. and Gorbunova, V. (2010) 'Analysis of DNA double-strand break (DSB) repair in mammalian cells', *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (43), p. 2002. doi:10.3791/2002.

Sève, P. and Dumontet, C. (2008) 'Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents?', *The Lancet. Oncology*, 9(2), pp. 168–175. doi:10.1016/S1470-2045(08)70029-9.

Shackelford, D.A. (2006) 'DNA end joining activity is reduced in Alzheimer's disease', *Neurobiology of Aging*, 27(4), pp. 596–605. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.009.

Shah, R.R. (2019) 'Safety and Tolerability of Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors in Oncology', *Drug Safety*, 42(2), pp. 235–245. doi:10.1007/s40264-018-0773-9.

Shanavas, A. and Papasozomenos, S.C. (2000) 'tau kinases in the rat heat shock model: possible implications for Alzheimer disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), pp. 14139–14144. doi:10.1073/pnas.97.26.14139.

Shanbhag, N.M. *et al.* (2019) 'Early neuronal accumulation of DNA double strand breaks in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), p. 77. doi:10.1186/s40478-019-0723-5.

Sharma, K.K.K., Swarts, S.G. and Bernhard, W.A. (2011) 'Mechanisms of direct radiation damage to DNA: the effect of base sequence on base end products', *The Journal of Physical Chemistry. B*, 115(16), pp. 4843–4855. doi:10.1021/jp200902h.

Shen, H. *et al.* (1998) 'Increased expression of DNA-dependent protein kinase confers resistance to adriamycin', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1381(2), pp. 131–138. doi:10.1016/s0304-4165(98)00020-8.

Shen, X. *et al.* (2016) 'Neurons in Vulnerable Regions of the Alzheimer's Disease Brain Display Reduced ATM Signaling', *eNeuro*, 3(1), p. ENEURO.0124-15.2016. doi:10.1523/ENEURO.0124-15.2016.

Shin, E., Lee, Y. and Koo, J.S. (2016) 'Differential expression of the epigenetic methylation-related protein DNMT1 by breast cancer molecular subtype and stromal histology', *Journal of Translational Medicine*, 14, p. 87. doi:10.1186/s12967-016-0840-x.

Silva, M.J. *et al.* (2005) 'Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46(2), pp. 104–115. doi:10.1002/em.20138.

Skok, Ž. *et al.* (2020) 'Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets', *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(3), pp. 884–904. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00726.

Sloboda, R.D., Dentler, W.L. and Rosenbaum, J.L. (1976) 'Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro', *Biochemistry*, 15(20), pp. 4497–4505. doi:10.1021/bi00665a026.

Slørdahl, T.S. *et al.* (2013) 'Anti-c-MET Nanobody - a new potential drug in multiple myeloma treatment', *European Journal of Haematology*, 91(5), pp. 399–410. doi:10.1111/ejh.12185.

Smoter, M. *et al.* (2013) 'Tau protein as a potential predictive marker in epithelial ovarian cancer patients treated with paclitaxel/platinum first-line chemotherapy', *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 32, p. 25. doi:10.1186/1756-9966-32-25.

So, C.L. *et al.* (2019) 'Calcium signalling and breast cancer', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 94, pp. 74–83. doi:10.1016/j.semcdb.2018.11.001.

Sola, M. *et al.* (2020) 'Tau affects P53 function and cell fate during the DNA damage response', *Communications Biology*, 3(1), p. 245. doi:10.1038/s42003-020-0975-4.

Solem, L.E., Henry, T.R. and Wallace, K.B. (1994) 'Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 129(2), pp. 214–222. doi:10.1006/taap.1994.1246.

Song, J. *et al.* (2005) 'Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer', *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 113(4), pp. 264–268. doi:10.1111/j.1600-0463.2005.apm\_04.x.

Sosa, V. *et al.* (2013) 'Oxidative stress and cancer: an overview', *Ageing Research Reviews*, 12(1), pp. 376–390. doi:10.1016/j.arr.2012.10.004.

Soulas-Sprauel, P. *et al.* (2007) 'V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining', *Oncogene*, 26(56), pp. 7780–7791. doi:10.1038/sj.onc.1210875.

Spicakova, T. *et al.* (2010) 'Expression and silencing of the microtubule-associated protein Tau in breast cancer cells', *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(11), pp. 2970–2981. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0780.

Stamer, K. *et al.* (2002) 'Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress', *The Journal of Cell Biology*, 156(6), pp. 1051–1063. doi:10.1083/jcb.200108057.

Stefansson, S. *et al.* (2001) 'Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), pp. 8135–8141. doi:10.1074/jbc.M007609200.

Stengel, K.R. and Hiebert, S.W. (2015) 'Class I HDACs Affect DNA Replication, Repair, and Chromatin Structure: Implications for Cancer Therapy', *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(1), pp. 51–65. doi:10.1089/ars.2014.5915.

Stiff, T. *et al.* (2004) 'ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation', *Cancer Research*, 64(7), pp. 2390–2396. doi:10.1158/0008-5472.can-03-3207.

Streffer, J.R. *et al.* (2003) 'Saitohin gene is not associated with Alzheimer's disease', *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74(3), pp. 362–363. doi:10.1136/jnnp.74.3.362.

Su, D. *et al.* (2009) 'Stathmin and tubulin expression and survival of ovarian cancer patients receiving platinum treatment with and without paclitaxel', *Cancer*, 115(11), pp. 2453–2463. doi:10.1002/cncr.24282.



Suberbielle, E. *et al.* (2013) 'Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- $\beta$ ', *Nature Neuroscience*, 16(5), pp. 613–621. doi:10.1038/nn.3356.

Sultan, A. *et al.* (2011) 'Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), pp. 4566–4575. doi:10.1074/jbc.M110.199976.

Sun, Z.-J. *et al.* (2010) 'Activation of PI3K/Akt/IKK-alpha/NF-kappaB signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma: its inhibition by quercetin', *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 15(7), pp. 850–863. doi:10.1007/s10495-010-0497-5.

Sündermann, F., Fernandez, M.-P. and Morgan, R.O. (2016) 'An evolutionary roadmap to the microtubule-associated protein MAP Tau', *BMC genomics*, 17, p. 264. doi:10.1186/s12864-016-2590-9.

Sweeney, C.J. *et al.* (2001) 'The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors', *Cancer Research*, 61(8), pp. 3369–3372.

Syme, C.D. *et al.* (2002) 'A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behaviour of natively unfolded proteins', *European Journal of Biochemistry*, 269(1), pp. 148–156. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02633.x.

## T

Taddei, A. *et al.* (2001) 'Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases', *Nature Cell Biology*, 3(2), pp. 114–120. doi:10.1038/35055010.

Tai, C. *et al.* (2020) 'Tau Reduction Prevents Key Features of Autism in Mouse Models', *Neuron* [Preprint]. doi:10.1016/j.neuron.2020.01.038.

Tan, D.S.P. *et al.* (2008) "'BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(34), pp. 5530–5536. doi:10.1200/JCO.2008.16.1703.

Tareen, B. *et al.* (2008) 'A 12 week, open label, phase I/IIa study using apatone for the treatment of prostate cancer patients who have failed standard therapy', *International Journal of Medical Sciences*, 5(2), pp. 62–67. doi:10.7150/ijms.5.62.

Teixeira, K.C. *et al.* (2008) 'Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine', *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 21(2), pp. 309–316. doi:10.1016/j.pupt.2007.07.006.

Telli, M.L. and Carlson, R.W. (2009) 'First-line chemotherapy for metastatic breast cancer', *Clinical Breast Cancer*, 9 Suppl 2, pp. S66-72. doi:10.3816/CBC.2009.s.007.

Teodoridis, J.M. *et al.* (2005) 'CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer', *Cancer Research*, 65(19), pp. 8961–8967. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1187.

- Testa, J.R. and Bellacosa, A. (2001) 'AKT plays a central role in tumorigenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp. 10983–10985. doi:10.1073/pnas.211430998.
- Tewey, K.M. *et al.* (1984) 'Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II', *Science (New York, N.Y.)*, 226(4673), pp. 466–468. doi:10.1126/science.6093249.
- Thadathil, N. *et al.* (2021) 'DNA Double-Strand Break Accumulation in Alzheimer's Disease: Evidence from Experimental Models and Postmortem Human Brains', *Molecular Neurobiology*, 58(1), pp. 118–131. doi:10.1007/s12035-020-02109-8.
- Theunis, C. *et al.* (2013) 'Efficacy and safety of a liposome-based vaccine against protein Tau, assessed in tau.P301L mice that model tauopathy', *PloS One*, 8(8), p. e72301. doi:10.1371/journal.pone.0072301.
- Thomas, S.N. *et al.* (2012) 'Quantitative proteomic analysis of mitochondrial proteins reveals prosurvival mechanisms in the perpetuation of radiation-induced genomic instability', *Free Radical Biology & Medicine*, 53(3), pp. 618–628. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.025.
- Thopan, P. *et al.* (2017) 'Low-Energy Ion-Species-Dependent Induction of DNA Double-Strand Breaks: Ion Energy and Fluence Thresholds', *Radiation Research*, 188(4), pp. 426–432. doi:10.1667/RR14721.1.
- Thwaites, D.I. and Tuohy, J.B. (2006) 'Back to the future: the history and development of the clinical linear accelerator', *Physics in Medicine and Biology*, 51(13), pp. R343–362. doi:10.1088/0031-9155/51/13/R20.
- Tobin, L.A. *et al.* (2012) 'Targeting abnormal DNA repair in therapy-resistant breast cancers', *Molecular cancer research: MCR*, 10(1), pp. 96–107. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0255.
- Tomiyama, A. *et al.* (2006) 'Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak', *Journal of the National Cancer Institute*, 98(20), pp. 1462–1473. doi:10.1093/jnci/djj395.
- Toulany, M. and Rodemann, H.P. (2013) 'Potential of Akt mediated DNA repair in radioresistance of solid tumors overexpressing erbB-PI3K-Akt pathway', *Translational Cancer Research*, 2(3). doi:10.21037/1124.
- Trachootham, D., Alexandre, J. and Huang, P. (2009) 'Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(7), pp. 579–591. doi:10.1038/nrd2803.
- Tremont, A., Lu, J. and Cole, J.T. (2017) 'Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review', *The Ochsner Journal*, 17(4), pp. 405–411.
- Tubbs, A. and Nussenzweig, A. (2017) 'Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer', *Cell*, 168(4), pp. 644–656. doi:10.1016/j.cell.2017.01.002.
- Turner, B.M., Birley, A.J. and Lavender, J. (1992) 'Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in Drosophila polytene nuclei', *Cell*, 69(2), pp. 375–384. doi:10.1016/0092-8674(92)90417-b.

Vale, R.D. *et al.* (1985) 'Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro', *Cell*, 43(3 Pt 2), pp. 623–632. doi:10.1016/0092-8674(85)90234-x.

Van Lint, C., Emiliani, S. and Verdin, E. (1996) 'The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation', *Gene Expression*, 5(4–5), pp. 245–253.

Vanier, M.T. *et al.* (1998) 'Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells', *Journal of Cell Science*, 111 ( Pt 10), pp. 1419–1432.

Villasante, A. *et al.* (1981) 'Binding of microtubule protein to DNA and chromatin: possibility of simultaneous linkage of microtubule to nucleic and assembly of the microtubule structure', *Nucleic Acids Research*, 9(4), pp. 895–908. doi:10.1093/nar/9.4.895.

Violet, M. *et al.* (2014) 'A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, p. 84. doi:10.3389/fncel.2014.00084.

Violet, M. *et al.* (2015) 'Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo', *Neurobiology of Disease*, 82, pp. 540–551. doi:10.1016/j.nbd.2015.09.003.

## W

Walker, J.R., Corpina, R.A. and Goldberg, J. (2001) 'Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair', *Nature*, 412(6847), pp. 607–614. doi:10.1038/35088000.

Walker, M.D. *et al.* (1978) 'Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial', *Journal of Neurosurgery*, 49(3), pp. 333–343. doi:10.3171/jns.1978.49.3.0333.

Walsh, D.W.M. *et al.* (2017) 'Live cell imaging of mitochondria following targeted irradiation in situ reveals rapid and highly localized loss of membrane potential', *Scientific Reports*, 7, p. 46684. doi:10.1038/srep46684.

Wang, B. *et al.* (2007) 'Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response', *Science (New York, N.Y.)*, 316(5828), pp. 1194–1198. doi:10.1126/science.1139476.

Wang, D. *et al.* (2019) 'Overexpression of MAPT-AS1 is associated with better patient survival in breast cancer', *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 97(2), pp. 158–164. doi:10.1139/bcb-2018-0039.

Wang, J.C. (2002) 'Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(6), pp. 430–440. doi:10.1038/nrm831.

Wang, Q. *et al.* (2013) 'Relationship between gastric cancer tau protein expression and paclitaxel sensitivity', *Pathology oncology research: POR*, 19(3), pp. 429–435. doi:10.1007/s12253-012-9598-5.

Wang, T. *et al.* (2016) 'Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway', *Oncotarget*, 7(3), pp. 2532–2544. doi:10.18632/oncotarget.6304.

- Wang, X. *et al.* (2014) 'Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1842(8), pp. 1240–1247. doi:10.1016/j.bbadis.2013.10.015.
- Warburg, O., Wind, F. and Negelein, E. (1927) 'THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY', *The Journal of General Physiology*, 8(6), pp. 519–530. doi:10.1085/jgp.8.6.519.
- Watts, A.S. *et al.* (2013) 'Metabolic syndrome and cognitive decline in early Alzheimer's disease and healthy older adults', *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 35(2), pp. 253–265. doi:10.3233/JAD-121168.
- Watts, J. and Nimer, S. (2018) 'Recent advances in the understanding and treatment of acute myeloid leukemia', *F1000Research*, 7, p. F1000 Faculty Rev-1196. doi:10.12688/f1000research.14116.1.
- Weaver, B.A. (2014) 'How Taxol/paclitaxel kills cancer cells', *Molecular Biology of the Cell*, 25(18), pp. 2677–2681. doi:10.1091/mbc.E14-04-0916.
- Wei, L. *et al.* (2015) 'DNA damage during the G0/G1 phase triggers RNA-templated, Cockayne syndrome B-dependent homologous recombination', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), pp. E3495-3504. doi:10.1073/pnas.1507105112.
- Wei, Y. *et al.* (2008) 'Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation', *PloS One*, 3(7), p. e2600. doi:10.1371/journal.pone.0002600.
- Weichert, Wilko *et al.* (2008) 'Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(6), pp. 1669–1677. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0990.
- Weichert, W. *et al.* (2008) 'Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy', *British Journal of Cancer*, 98(3), pp. 604–610. doi:10.1038/sj.bjc.6604199.
- Weiffenbach, B. and Haber, J.E. (1981) 'Homothallic mating type switching generates lethal chromosome breaks in rad52 strains of *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular and Cellular Biology*, 1(6), pp. 522–534. doi:10.1128/mcb.1.6.522-534.1981.
- Weinberg, F. *et al.* (2010) 'Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), pp. 8788–8793. doi:10.1073/pnas.1003428107.
- Weinberg, F. and Chandel, N.S. (2009) 'Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 66(23), pp. 3663–3673. doi:10.1007/s00018-009-0099-y.
- Weiner-Gorzel, K. and Murphy, M. (2021) 'Mitochondrial dynamics, a new therapeutic target for Triple Negative Breast Cancer', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1875(2), p. 188518. doi:10.1016/j.bbcan.2021.188518.
- Weingarten, M.D. *et al.* (1975) 'A protein factor essential for microtubule assembly', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), pp. 1858–1862. doi:10.1073/pnas.72.5.1858.

- Weissman, L. *et al.* (2007) 'Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment', *Nucleic Acids Research*, 35(16), pp. 5545–5555. doi:10.1093/nar/gkm605.
- Welty, S. *et al.* (2018) 'RAD52 is required for RNA-templated recombination repair in post-mitotic neurons', *The Journal of Biological Chemistry*, 293(4), pp. 1353–1362. doi:10.1074/jbc.M117.808402.
- Wilhelm, T. *et al.* (2014) 'Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(2), pp. 763–768. doi:10.1073/pnas.1311520111.
- Wilhelm, T. *et al.* (2016) 'Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress', *PLoS genetics*, 12(5), p. e1006007. doi:10.1371/journal.pgen.1006007.
- Wilhelm, T. *et al.* (2019) 'Mild replication stress causes chromosome mis-segregation via premature centriole disengagement', *Nature Communications*, 10(1), p. 3585. doi:10.1038/s41467-019-11584-0.
- Wise, D.R. *et al.* (2008) 'Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), pp. 18782–18787. doi:10.1073/pnas.0810199105.
- Witsch, E., Sela, M. and Yarden, Y. (2010) 'Roles for growth factors in cancer progression', *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(2), pp. 85–101. doi:10.1152/physiol.00045.2009.
- Wittrup, A. and Lieberman, J. (2015) 'Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics', *Nature Reviews. Genetics*, 16(9), pp. 543–552. doi:10.1038/nrg3978.
- Woenckhaus, M. *et al.* (2006) 'Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers', *The Journal of Pathology*, 210(2), pp. 192–204. doi:10.1002/path.2039.
- Wray, S. *et al.* (2008) 'Direct analysis of tau from PSP brain identifies new phosphorylation sites and a major fragment of N-terminally cleaved tau containing four microtubule-binding repeats', *Journal of Neurochemistry*, 105(6), pp. 2343–2352. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05321.x.
- Wu, H. *et al.* (2013) 'Regulation of microtubule-associated protein tau (MAPT) by miR-34c-5p determines the chemosensitivity of gastric cancer to paclitaxel', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(5), pp. 1159–1171. doi:10.1007/s00280-013-2108-y.
- Wu, S. *et al.* (2011) 'Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins', *The FEBS journal*, 278(6), pp. 941–954. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08010.x.

## Y

- Yamamori, T. *et al.* (2012) 'Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint', *Free Radical Biology & Medicine*, 53(2), pp. 260–270. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033.

Yamane, K., Taylor, K. and Kinsella, T.J. (2004) 'Mismatch repair-mediated G2/M arrest by 6-thioguanine involves the ATR-Chk1 pathway', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(1), pp. 297–302. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.030.

Yamauchi, A. *et al.* (2017) 'Functional role of the Tau protein in epithelial ovarian cancer cells', *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), pp. 143–151. doi:10.1002/rmb2.12019.

Yan, T. *et al.* (2003) 'DNA mismatch repair (MMR) mediates 6-thioguanine genotoxicity by introducing single-strand breaks to signal a G2-M arrest in MMR-proficient RKO cells', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(6), pp. 2327–2334.

Yang, D. *et al.* (2011) 'Association of BRCA1 and BRCA2 mutations with survival, chemotherapy sensitivity, and gene mutator phenotype in patients with ovarian cancer', *JAMA*, 306(14), pp. 1557–1565. doi:10.1001/jama.2011.1456.

Ye, J. *et al.* (2016) 'miR-186 regulates chemo-sensitivity to paclitaxel via targeting MAPT in non-small cell lung cancer (NSCLC)', *Molecular bioSystems*, 12(11), pp. 3417–3424. doi:10.1039/c6mb00576d.

Yoshida, S. *et al.* (2013) 'Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), pp. E1604-1612. doi:10.1073/pnas.1220659110.

Young, R.C. *et al.* (1990) 'Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials', *The New England Journal of Medicine*, 322(15), pp. 1021–1027. doi:10.1056/NEJM199004123221501.

Yu, Y.P. *et al.* (2007) 'Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis', *Cancer Research*, 67(17), pp. 8043–8050. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0648.

## Z

Zaman, S. *et al.* (2019) 'MAPT (Tau) expression is a biomarker for an increased rate of survival for low-grade glioma', *Oncology Reports*, 41(2), pp. 1359–1366. doi:10.3892/or.2018.6896.

Zhang, C.C. *et al.* (1999) 'DNA damage increases sensitivity to vinca alkaloids and decreases sensitivity to taxanes through p53-dependent repression of microtubule-associated protein 4', *Cancer Research*, 59(15), pp. 3663–3670.

Zhang, Y. *et al.* (2007) 'Attenuated DNA damage repair by trichostatin A through BRCA1 suppression', *Radiation Research*, 168(1), pp. 115–124. doi:10.1667/RR0811.1.

Zhang, Y., Rohde, L.H. and Wu, H. (2009) 'Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair', *Current Genomics*, 10(4), pp. 250–258. doi:10.2174/138920209788488544.

Zheng, J. *et al.* (2020) 'Hippocampal tau oligomerization early in tau pathology coincides with a transient alteration of mitochondrial homeostasis and DNA repair in a mouse model of tauopathy', *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), p. 25. doi:10.1186/s40478-020-00896-8.

Zhou, J. *et al.* (2011) 'PRL-3, a metastasis associated tyrosine phosphatase, is involved in FLT3-ITD signaling and implicated in anti-AML therapy', *PloS One*, 6(5), p. e19798. doi:10.1371/journal.pone.0019798.

Zhou, J. *et al.* (2015) 'A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNM1L-mediated mitochondrial fission', *Autophagy*, 11(8), pp. 1259–1279. doi:10.1080/15548627.2015.1056970.

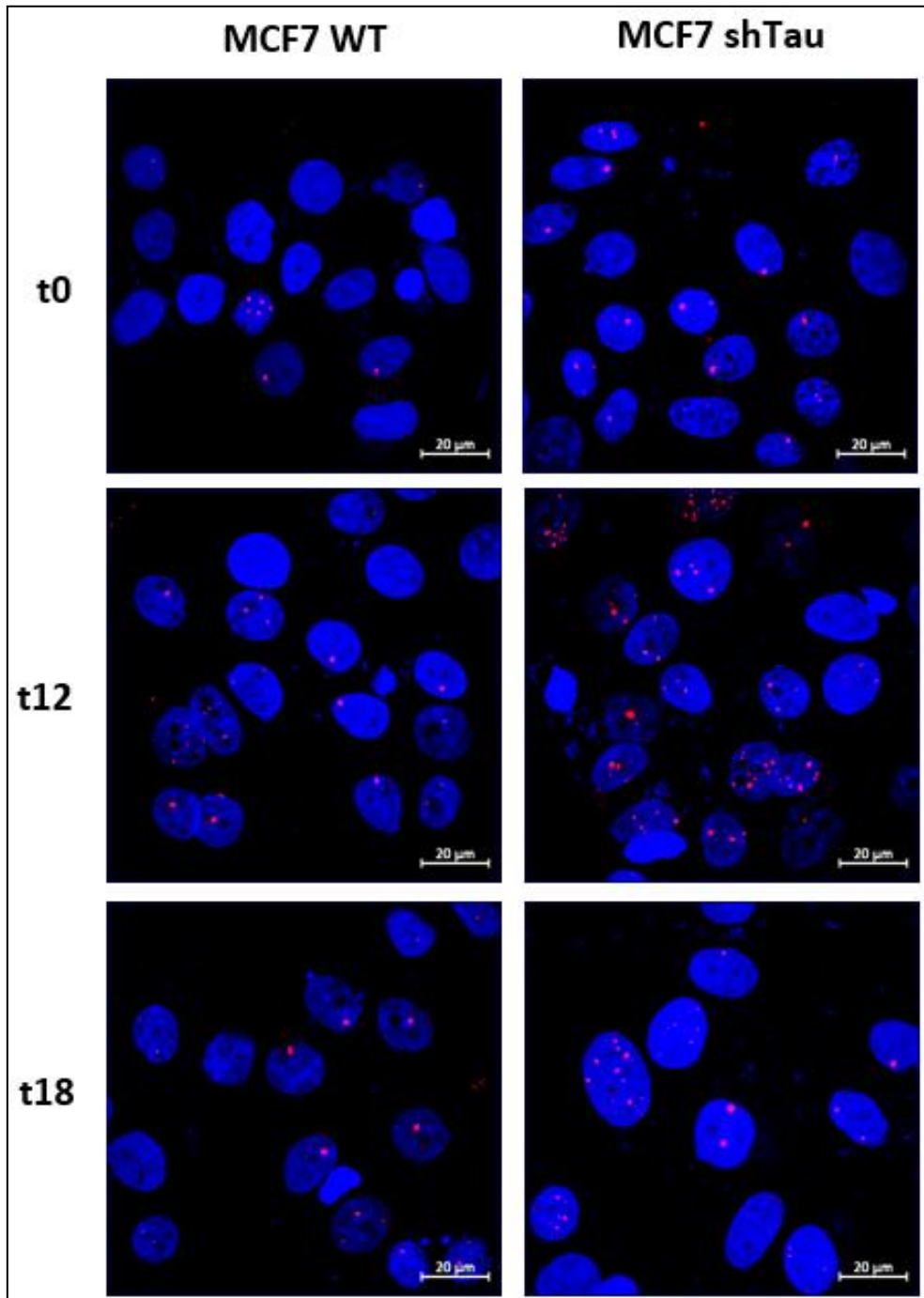
Zhu, H. *et al.* (2020) 'Harnessing DNA Replication Stress for Novel Cancer Therapy', *Genes*, 11(9), p. E990. doi:10.3390/genes11090990.

Zuckerman, J.E. and Davis, M.E. (2015) 'Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14(12), pp. 843–856. doi:10.1038/nrd4685.

# **ANNEXES**

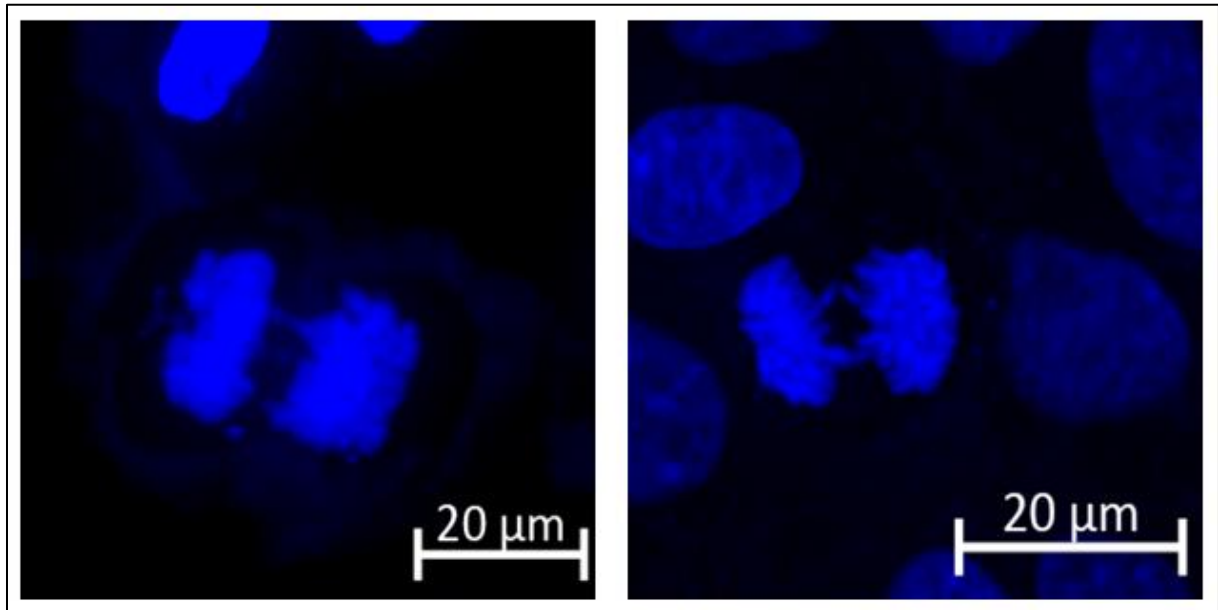


## ANNEXE 1



**Figure annexe 1. Présence de 53BP1 nuclear bodies dans les MCF7 shCtrl et shTau.** Les MCF7 shCtrl et shTau ont été synchronisées par double thymidine block selon le protocole de (Chen and Deng, 2018) et relâchées dans le cycle puis fixées immédiatement (t0), 12 heures (t12) et 18 heures (t18) après l'arrêt du blocage. La présence de 53BP1 nuclear bodies est caractérisée par un anticorps anti-53BP1 et un anticorps secondaires couplé à un fluorophore émettant une fluorescence dans le rouge (Alexa 568). Les images sont acquises par microscopie confocale.

## ANNEXE 2



**Figure annexe 2. Présence d'anaphase bridges dans les MCF7 shTau.** Des cellules MCF7 shTau ont été fixées traitées au DAPI pour visualiser l'ADN. Les images sont acquises par microscopie confocale.