

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIERE, DU RAYONNEMENT

ET DE L'ENVIRONNEMENT

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Discipline : Molécules et Matières Condensées

Biochimie et biologie moléculaire

Présentée par

Anthony DACCACHE

**Etude du mécanisme d'agrégation de la protéine Tau
et son inhibition par des composés polyphénoliques**

Soutenue publiquement le 09 Décembre 2011

Directeur de thèse : Pr. Philippe COTELLE et Dr Guy LIPPENS

JURY

Pr. Jean-Pierre BRION	Rapporteur
Pr. Jean-Pierre MONTI	Rapporteur
Dr. Iuliana BOTEZ-POP	Examinatrice
Dr. Mélanie GERARD	Examinatrice
Pr. Philippe COTELLE	Directeur de Thèse
Dr. Guy LIPPENS	Directeur de Thèse

*A mon Grand-Père Tanios,
Mes Parents, Aurore, Darius...*

*« "Alzheimer"... C'est un mal qui vole les cœurs, les âmes et les souvenirs. » **Nicholas Sparks***

*«La clé de la réussite, c'est le désir.» **Al Pacino***

Remerciements

A **Mesdames et Messieurs les rapporteurs et examinateurs** pour avoir consacré du temps afin de lire et de juger ce travail. Leur présence dans mon jury m'honore.

A mes directeurs de thèse, **Philippe Cotelle** et **Guy Lippens**, pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes et m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse dans de très bonnes conditions. Merci Philippe d'avoir découvert ses molécules « miracles » et d'avoir fait le DJ pendant que je remplissais mes 384 puits de molécules. Merci Guy de m'avoir soutenu et motivé tout le long de ces trois ans malgré mes lacunes et mon manque d'expérience.

A **Isabelle Landrieu**, qui m'a montré dès le début le chemin des manip en m'expliquant comment utiliser toutes ces machines que je n'avais jamais vu auparavant. Merci également pour tes conseils scientifiques avisés qui ont permis de résoudre mes problèmes.

A **Jean-Michel Wieruszeski**, pour avoir partagé tes goûts cinématographiques avec moi comme son amour pour les Eastwoods et pour ta présence lorsque je travaillais seul dans le bunker. Je te souhaite un bon rétablissement et reviens vite.

A **Mélanie Gérard**, pour toute sa gentillesse, tout le temps qu'elle m'a consacré et pour m'avoir laissé utiliser cet appareil magique qui m'a fait économiser énormément de temps.

A **Xavier Hanouille**, toujours présents lorsqu'on a besoin de lui (préfiltre bouché, problème d'ordinateur...).

A **Arnaud Leroy**, pour toutes tes idées réalisables ou pas et tes précieux conseils en matière de fluorescence.

A **Christian Slomianny**, pour son humour, tout le temps qu'il m'a consacré pour ces belles images de microscopie électronique et pour le partage de connaissance sur le HD2.

A **Gérard Montagne**, qui profite de sa retraite dans son camping-car, mais qui a toujours fait preuve de gentillesse et d'écoute.

A **Caroline Smet**, ma voisine de paillasse qui a continué à m'adresser la parole malgré l'avoir appelée plusieurs fois Charlotte.

A **Isabelle Huvent**, pour ta disponibilité, tes conseils techniques, ton soutien. Merci pour toutes les fois où tu étais présente lorsque j'avais besoin de ton aide. Et merci pour toutes les histoires qui ont accompagné nos repas au RU.

A **Fanny Bonachera et Dries Verdegem**, avec qui j'ai partagé beaucoup de beaux moments.

A l'équipe des chimistes **Cédric Lion, Fabrice Bailly et Virginie Suchaud**, pour leur bonne humeur et leurs connaissances. Merci Cédric d'avoir été présent tout au long de mes trois ans de thèse, pour ton soutien moral et toutes tes explications.

A **Laziza Aminai**, ou « Morfalou » pour les intimes, pour ton sourire, ta bonne humeur, tes bons conseils pour produire plus de protéines et pour toutes les connaissances que tu m'as transmises.

A **Nathalie Sibille**, ou « Sibiiiiillleeee », pour ta présence, ta franchise, ton soutien, tes encouragements et pour toutes les connaissances que tu m'as apportées. Merci également pour les heures et les week-ends que tu as passés avec moi pour prendre des spectres RMN.

A **mes anciens collègues de Master Recherche**, avec qui j'ai beaucoup beaucoup appris et avec qui j'ai passé d'excellent moment enrichissant autant du point de vue humain que scientifique.

A **mes amis**, qui sont presque tous passé par la case thèse et qui m'ont donné la force et le courage d'arriver au bout de mon projet.

A **Aurore**, merci d'avoir été présente au quotidien, de m'avoir soutenu, de m'avoir motivé et de me m'avoir redonné le sourire lorsque je ne me sentais pas bien. J'espère que tu resteras longtemps à mes côtés.

A **mes parents, ma sœur et mon frère**, qui m'ont toujours soutenu dans tout ce que j'ai entrepris et qui je l'espère resteront à mes côtés pour longtemps.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes au sein de l'unité que j'ai pu côtoyer durant ces trois années riches en expériences.

Table des matières

Table des matières	- 5 -
Liste des abréviations	- 8 -
Résumé	- 9 -
INTRODUCTION.....	- 10 -
1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer	- 11 -
1.1. Historique	- 11 -
1.2. Caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer.....	- 14 -
1.2.1. Lésions neuropathologiques.....	- 14 -
1.2.1.1. Altérations macroscopiques.....	- 14 -
1.2.1.2. Altérations microscopiques.....	- 15 -
➤ Dépôts amyloïdes.....	- 15 -
➤ Dégénérescence neurofibrillaire.....	- 17 -
1.3. Progression des dégénérescences neurofibrillaires.....	- 18 -
1.3.1. Progression biochimique	- 18 -
1.3.2. Progression cytologique	- 18 -
1.3.3. Différents types de filaments.....	- 20 -
2. La protéine Tau.....	- 22 -
2.1. Structure de la protéine Tau.....	- 22 -
2.2. Modifications post-traductionnelles de la protéine Tau.....	- 24 -
2.2.1. Glycosylation	- 24 -
2.2.2. Phosphorylation	- 24 -
3. Fonctions de la protéine Tau.....	- 26 -
3.1. Stabilisation des microtubules.....	- 26 -
3.2. Transport axonal.....	- 27 -
4. Agrégation et formation de PHFs.....	- 28 -
4.1. Phosphorylation pathologique de la protéine Tau.....	- 28 -
4.2. Importance des PHF6 et PHF6*	- 34 -
4.3. Importance des Cystéines 291 et 322 dans la formation des PHFs	- 37 -

4.4. Facteurs impliqués dans l'agrégation de la protéine Tau <i>in vitro</i>	- 39 -
4.4.1. L'effet du DTT sur la formation de filaments.....	- 40 -
4.4.2. L'implication de l'héparine dans le processus d'agrégation	- 42 -
4.4.3. L'agrégation à différentes températures.....	- 43 -
4.4.4. L'effet du pH sur l'agrégation.....	- 44 -
5. Modèles animaux de la maladie d'Alzheimer.....	- 47 -
5.1. Les modèles DFTP-17 en présence de la mutation P301L.....	- 47 -
6. Infection de type prion.....	- 52 -
7. Les traitements dirigés contre l'agrégation de Tau.....	- 53 -
7.1. Inhibition de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.....	- 53 -
7.2. Inhibition de l'agrégation de la protéine Tau.....	- 54 -
7.3. Le rôle des polyphénols.....	- 57 -
7.3.1. Resvératrol et stilbénoides.....	- 58 -
7.3.2. Epigallocatechine-3-gallate et Flavonoïde.....	- 59 -
7.3.3. Curcumin.....	- 60 -
7.3.4. Acide rosmarinique.....	- 61 -
7.4. L'effet des polyphénols sur l'agrégation de Tau.....	- 61 -
7.4.1. Polyphénols dans l'olive et l'huile d'olive.....	- 62 -
 MATERIEL ET METHODES.....	 - 67 -
1. Production de la protéine Tau 441 humaine recombinante.....	- 68 -
1.1. Production.....	- 68 -
1.2. Purification.....	- 69 -
2. Production de la protéine Tau 441 humaine recombinante.....	- 69 -
2.1. Spectre HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence).....	- 69 -
3. Etude de l'agrégation <i>in vitro</i>	- 71 -
3.1. Mesure de l'agrégation par diffusion de la lumière ou Light Scattering	- 71 -
3.2. Mesure de l'agrégation par fluorescence de la Thioflavine S	- 71 -
4. Molécules testées.....	- 72 -

5. Observation par microscopie électronique.....	- 84 -
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	- 85 -
1. Mise en place des meilleures conditions d'agrégation in-vitro.....	- 87 -
1.1. Objectifs.....	- 87 -
1.2. Résultats et discussions.....	- 90 -
1.2.1. L'implication de l'héparine dans le processus d'agrégation	- 92 -
1.2.2. L'importance d'un milieu réducteur.....	- 94 -
1.2.3. Choix du meilleur pH pour suivre l'agrégation.....	- 95 -
1.2.4. Différence d'agrégation entre Tau WT et Tau P301L.....	- 101 -
1.3. Conclusion.....	- 104 -
2. Etude de l'agrégation sur un fragment de la protéine Tau.....	- 105 -
2.1. Objectifs.....	- 105 -
2.2. Résultats et discussions.....	- 107 -
2.3. Conclusion.....	- 111 -
3. La capacité anti agrégative de molécules naturelles polyphénoliques.....	- 113 -
3.1. Objectifs.....	- 113 -
3.2. Résultats et discussions.....	- 113 -
3.2.1. Les polyphénols dérivés de l'huile d'olive.....	- 113 -
3.2.2. Les polyphénols endogènes.....	- 124 -
3.2.3. Les polyphénols dérivés du romarin.....	- 130 -
3.3. Conclusion.....	- 133 -
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	- 136 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 139 -

Liste des abréviations

AA	Acide Aminé
A β	peptide Amyloïde β
APP	Amyloid Precursor Protein
CDK	Cyclin Dependent Kinase
DA	Dépôts Amyloïdes
DFTP-17	Démences Fronto-Temporales associés à un Parkinsonisme lié au chromosome 17
DNF	Dégénérescence Neuro Fibrillaire
DTT	Dithiothréitol
GSK	Glycogen synthase kinase
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	Concentration à laquelle un composé inhibe 50% de l'agrégation
LS	Light Scattering
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Microtubule Associated Protein
MT	MicroTubule
MTB domain	MicroTubule Binding domain
MTBR	MicroTubule Binding Region
NFT	Neurofibrillary Tangles
PHF	Paired Helical Filaments
PS	Plaque sénile
SF	Straight Filaments
ThS	Thioflavine S

Résumé

Les isoformes de Tau font parties d'une famille de protéines associées aux microtubules, principalement exprimées dans les neurones du système nerveux central. Ils favorisent l'assemblage de monomères tubuline en microtubules et leurs stabilités, jouant un rôle structural clé dans les axones neuronaux. Dans la maladie d'Alzheimer et autres tauopathies, la protéine Tau agrège sous forme d'enchevêtrements fibrillaires impliqués dans les lésions intraneuronales et gliales. A l'heure actuelle, le processus d'agrégation présent au sein des tauopathies n'est pas complètement élucidé malgré un grand nombre d'études effectués *in vitro*.

L'essentiel du travail présenté dans ma thèse est basé sur un modèle d'étude *in vitro* utilisant une protéine Tau recombinante présentant la mutation P301L. Ce mutant ainsi que d'autres fragments de Tau ont été utilisés pour mieux comprendre le mécanisme d'agrégation, comme par exemple le rôle des cystéines, ou de la région riche en proline. Nous avons montré par des mesures de diffusion de la lumière et fluorescence de la Thioflavine S qu'il existe un système d'agrégation indépendant des ponts disulfures intermoléculaires.

Nous avons également étudié la capacité anti agrégative de plusieurs polyphénols naturels et endogènes. Notre attention s'est en particulier portée sur trois dérivés phénoliques obtenus à partir d'huile d'olive : l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine, l'oleuropéine aglycone. Ce dernier a été trouvé plus actif que l'inhibiteur de référence de Tau, le bleu de méthylène. Des résultats similaires ont été obtenu avec des molécules issues de la dimérisation du DOPAL. L'activité inhibitrice de la fibrillisation de ces molécules peut même atteindre des valeurs submicromolaires.

Mots clés : Tau, P301L, Agrégation, Thioflavine, Cystéine, Oléuropeine, Hydroxytyrosol.

INTRODUCTION

1. Généralités

1.1. Historique

Avant 1906, la démence d'une personne âgée était considérée par de nombreux psychiatres et par la population comme faisant partie du processus normal de vieillissement. Cette définition de la démence fut bouleversée par les découvertes du neurologue et psychiatre allemand, Alois Alzheimer. En 1906, suite au décès de sa patiente Auguste D. présentait une dégradation progressive de ses facultés cognitives, le Dr Alzheimer pratiqua une autopsie de son cerveau. L'examen au microscope du cortex cérébral de la patiente révéla la présence de lésions semblables à celles de la démence sénile, les plaques séniles (ou plaques amyloïdes), associées à des lésions jusqu'alors inconnues, les dégénérescences neurofibrillaires, caractérisées par des amas anormaux de fibrilles dans les neurones (Figure 1). Le 4 novembre 1906, lors de la 37e Conférence des psychiatres allemands à Tübingen, Alois Alzheimer décrivit pour la première fois un type de démence qui, à l'initiative de son collègue Emil Kraepelin, sera plus tard connu sous le nom de maladie d'Alzheimer (MA).

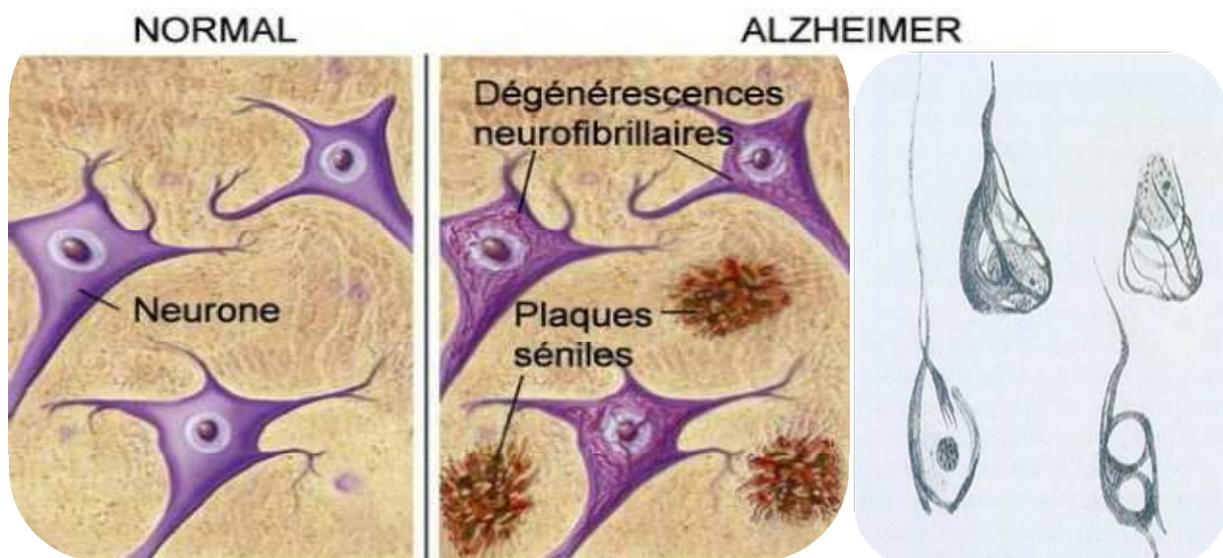


Figure 1 : Représentation des dégénérescences neurofibrillaires (d'après www.ahaf.org/alzheimers et dessin original d'Alois Alzheimer).

Vingt ans plus tard, le psychiatre belge Paul Divry constata que les plaques séniles décrites par Alois Alzheimer pouvaient être colorées, tout comme certaines substances amyloïdes, par la thioflavine ou le rouge Congo, leur donnant ainsi le nom de plaques amyloïdes (PA). Cependant, il fallut attendre le dernier tiers du XX^{ème}-siècle pour que les connaissances relatives à la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) évoluent de façon significative. Le développement de la microscopie électronique permit à Kidd et coll. (Kidd 1963) de découvrir l'existence de paires de filaments appariés en hélice, ou « paired helical filament » (PHF) en 1963, au sein des dégénérescences neurofibrillaires. L'évolution de la biologie moléculaire au cours des années 60, permit la caractérisation du peptide amyloïde β (A β), constituant principal des PA (Glenner et al 1984) et la mise en évidence de la protéine Tau dans les PHF (Brion et al 1985), tandis que Grundke-Iqbal et coll. (Grundke-Iqbal et al 1986) démontrèrent que la protéine Tau, présente dans les PHF, est anormalement phosphorylée. En 1989, Flament et coll. (Flament et al 1989) suggèrent que les protéines Tau sont les marqueurs de la dégénérescence neurofibrillaire. Deux grandes hypothèses tentèrent alors d'expliquer les causes de la MA : l'hypothèse de la cascade amyloïde, qui a pour élément central le peptide A β et la formation des PA, et l'hypothèse tauïste qui postule que le facteur déclenchant est la phosphorylation anormale de la protéine Tau et la formation des PHF.

L'apparition de dépôts fibrillaires dans ces tauopathies suggère qu'ils ont un rôle clé dans les symptômes cliniques observés. Cependant, aucune mutation n'a été identifiée dans la MA, tandis que les formes précoces héréditaires de la maladie peuvent résulter de mutations sur la protéine APP qui entraîne une expression plus importante du peptide A β présent dans les plaques caractéristiques de la MA (Selkoe et al 2003). Ces données génétiques ont conduit à une focalisation des études sur le peptide A β qui, bien que toujours répandues, ont été tempérées par la découverte récente de mutations sur la protéine Tau présente dans les DFTP-17 (démences fronto-temporales associés à un parkinsonisme lié au chromosome 17) (Goedert & Jakes 2005, Spillantini et al 1998). Le cerveau de patients atteints de DFTP, DCB (dégénérescence cortico-basale) et PSP (paralysie supranucléaire progressive) contiennent en effet

également des fibres composées de la protéine Tau. Cette caractéristique pathologique commune leur donna le nom de tauopathies, malgré une distinction claire dans les manifestations phénotypiques de ces troubles. Dans le cas de la MA, il existe des preuves qui suggèrent que le peptide A β et la protéine Tau sont des agents pathogènes. Bien que le lien entre ces deux molécules ne soit pas bien connu, le point de vue dominant est que les peptides A β agrégés provoqueraient l'agrégation de Tau (Hardy & Selkoe 2002).

Notre équipe s'intéresse à la DNF retrouvée dans des syndromes démentiels apparentés à la MA et regroupés sous le terme de Tauopathies. Nous avons donc centré nos études autour de la protéine neuronale Tau impliquée dans la MA en utilisant des outils liés au domaine de la biochimie *in vitro*. Nous avons abordé plusieurs facettes de cette large problématique:

- En mettant tout d'abord au point les meilleures conditions d'agrégation *in vitro*.
- Puis, en essayant de comprendre l'importance des Cystéines 291 et 322 dans le processus d'agrégation.
- Enfin en évaluant la capacité anti agrégative de molécules naturelles polyphénoliques synthétiques ou naturelles (issues de plantes de médecine traditionnelle et/ou de plantes culinaires).

1.2 Caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer

1.2.1 Lésions neuropathologiques

Le diagnostic certain de la MA peut être donné lors de l'autopsie du patient et de l'analyse de son tissu cérébral. La nature neurodégénérative de la MA se traduit par une atrophie cérébrale importante et l'accumulation de deux lésions histopathologiques caractéristiques : les dépôts amyloïdes qui sont des agrégats extracellulaires de peptides amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires qui sont des agrégats intraneuronaux formés de paires de filaments appariés en hélice ou en filaments non torsadés. C'est la présence conjointe de ces deux éléments qui définit la MA.

1.2.1.1 Altérations macroscopiques :

Au niveau macroscopique, le cerveau des patients atteints de la MA présente une atrophie importante du tissu cérébral en parallèle d'une augmentation du volume des ventricules cérébraux et des sillons corticaux (Figure 2). Cette atrophie touche principalement le lobe temporal médian (hippocampe, cortex entorhinal et amygdale) et le lobe frontal, et serait le reflet, au moins en partie, d'une perte neuronale importante entraînant une réduction du ruban cortical.

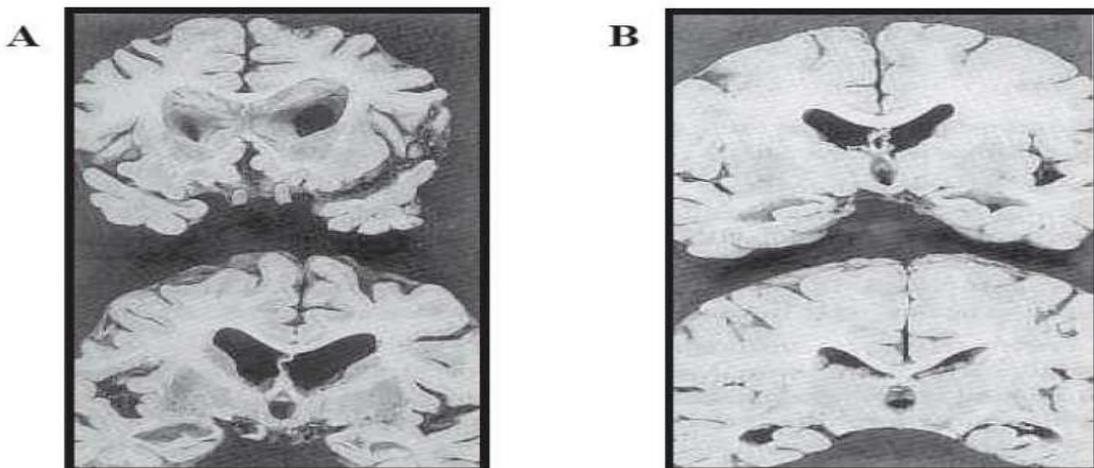


Figure 2 : Coupes de cerveaux de patient Alzheimer (A) et d'une personne du même âge non atteinte de pathologie neurodégénérative (B). Une atrophie cérébrale et une dilatation ventriculaire sont observées chez le malade Alzheimer (d'après Pr. J.J. Hauw, Paris).

1.2.1.2 Altérations microscopiques :

➤ Les dépôts amyloïdes :

Les dépôts amyloïdes sont des marqueurs du vieillissement cérébral normal, toutefois, on les retrouve chez les patients sains à des taux beaucoup plus faibles que ceux retrouvés dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. On distingue deux types de dépôts cérébraux, des dépôts amyloïdes dits « diffus » et des dépôts plus denses, les plaques séniles.

Les plaques séniles (Figure 3) sont formées de faisceaux de filaments compacts d'un diamètre de 6 à 10 nanomètres (nm), situés dans le domaine extracellulaire. Le constituant majeur de ces plaques est un peptide amyloïde dénaturé de 39 à 43 acides aminés, ayant une structure en feuillets β -plissés, également appelé peptide A β (Glennner et al 1984).

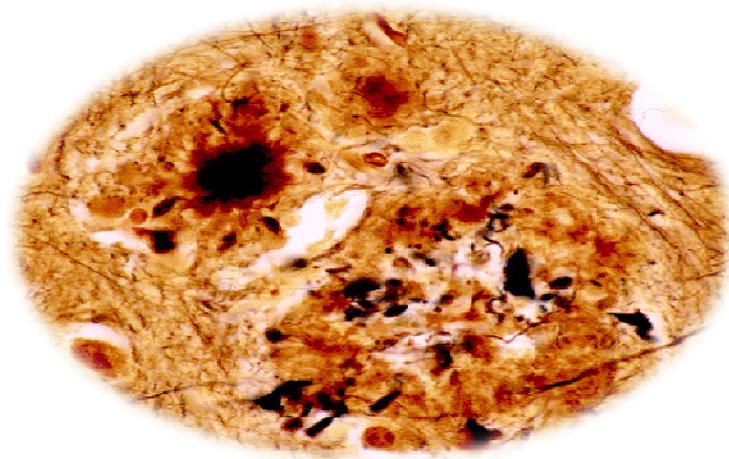


Figure 3 : Imprégnation argentique d'une coupe de cortex de patient atteint de la MA présentant des plaques séniles (en noir).

Ce peptide physiologique de 4 kDa est issu du clivage protéolytique séquentiel de son précurseur amyloïde (APP) par deux enzymes : la β -sécrétase et la γ -sécrétase (Figure 4). La voie métabolique de l'APP conduisant à la production d'A β est appelée « voie amyloïdogénique » de l'APP. Les extrémités amino- et carboxy-terminales du peptide A β peuvent être clivées à différents sites, générant ainsi plusieurs formes d'A β . Les formes d'A β_{42} (clivées à l'acide aminé 42), dont les capacités agrégatives sont plus importantes que celles des formes d'A β_{40}

(clivées à l'acide aminé 40), représentent les constituants majeurs des dépôts amyloïdes. Les formes d'A β ₄₀, quant à elles, sont retrouvées principalement au niveau de la paroi des vaisseaux cérébraux (Herzig et al 2006).

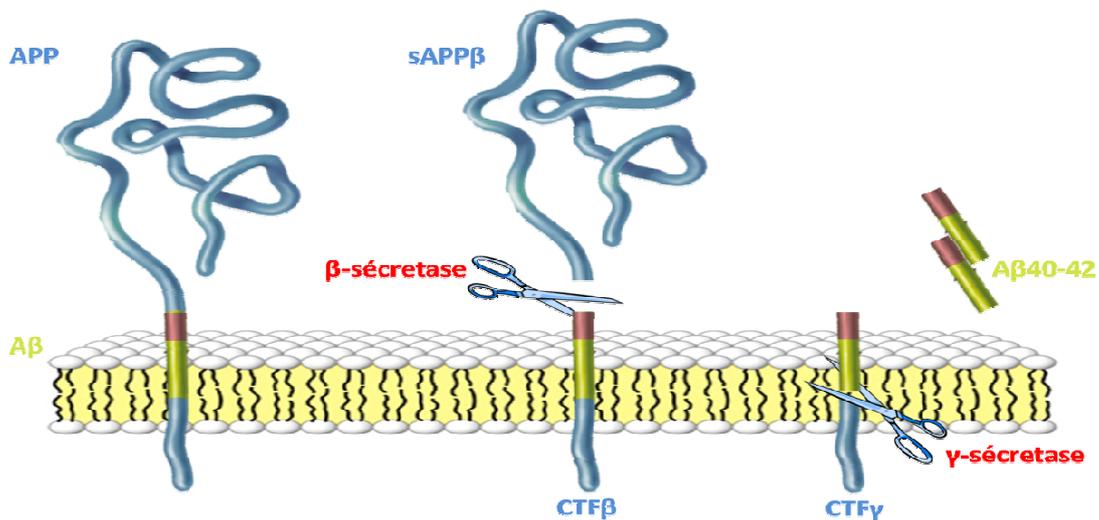


Figure 4 : Représentation de la voie de clivage amyloïdogène de la β APP.

Il existe également une autre voie de dégradation de l'APP, non génératrice d'A β , dite « voie non-amyloïdogénique » (Figure 5). Dans ce cas, l'enzyme α -sécrétase va cliver l'APP au milieu de la séquence correspondant à l'A β prévenant ainsi la formation de ce dernier. Cette voie permet également la production du fragment sAPP α , aux propriétés trophiques et neuroprotectrices (Mattson et al 1997).

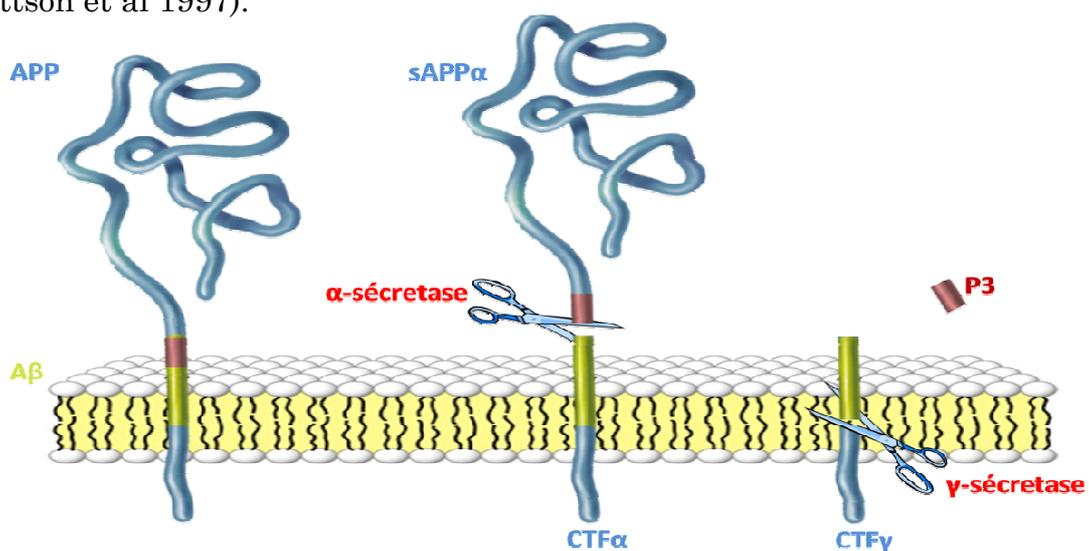


Figure 5 : Représentation de la voie de clivage non-amyloïdogène de la β APP.

Comme nous l'avons vu précédemment, les cerveaux de patients malades présentent également des dégénérescences neurofibrillaires.

➤ **Dégénérescence neurofibrillaire**

La dégénérescence neurofibrillaire est une lésion histopathologique dans le cerveau des patients atteints de la MA. Cette lésion est en réalité la caractéristique commune d'une vingtaine de maladies neurodégénératives regroupées sous le terme de tauopathies, parmi lesquelles on peut citer la démence frontotemporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (DFTP-17), la dégénérescence corticobasale ou encore le syndrome de Down (Buee et al 2000). La DNF se manifeste par la présence de filaments pathologiques à l'intérieur du corps cellulaire du neurone et du dendrite apical. Les neurones qui sont touchés de manière préférentielle par les DNF sont les cellules pyramidales du cortex entorhinal, de l'hippocampe et du néocortex.

Ces entrelacs intra-cellulaires présentent les mêmes propriétés physico-chimiques que les dépôts amyloïdes et peuvent être détectés de la même manière (coloration au Bielchowski, Thioflavine et rouge Congo) (Figure 6).

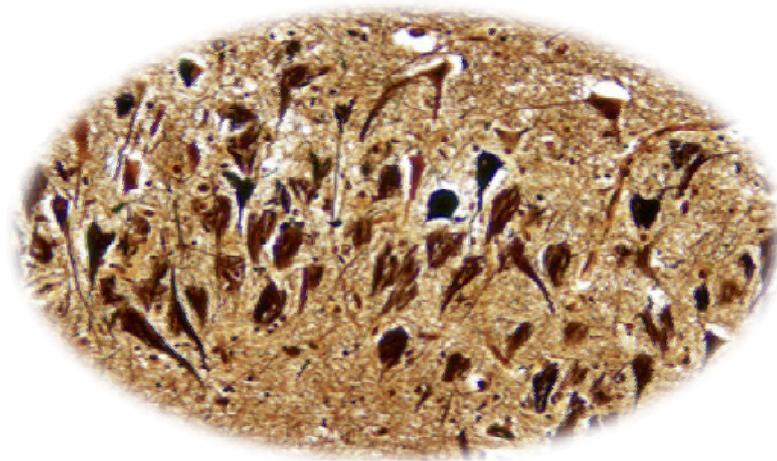


Figure 6 : Coloration au Bielchowski d'entrelacs intra-cellulaires.

1.3 Progression des dégénérescences neurofibrillaires

1.3.1 Progression biochimique

La pathologie neurofibrillaire évolue au niveau du cerveau d'une manière très ordonnée et bien spécifique selon le stade de la maladie. On distingue 10 stades différents dans la progression de la DNF, correspondant chacun aux régions cérébrales touchées au cours de la MA (Delacourte et al 1999) et les 10 stades sont regroupés en 3 phases :

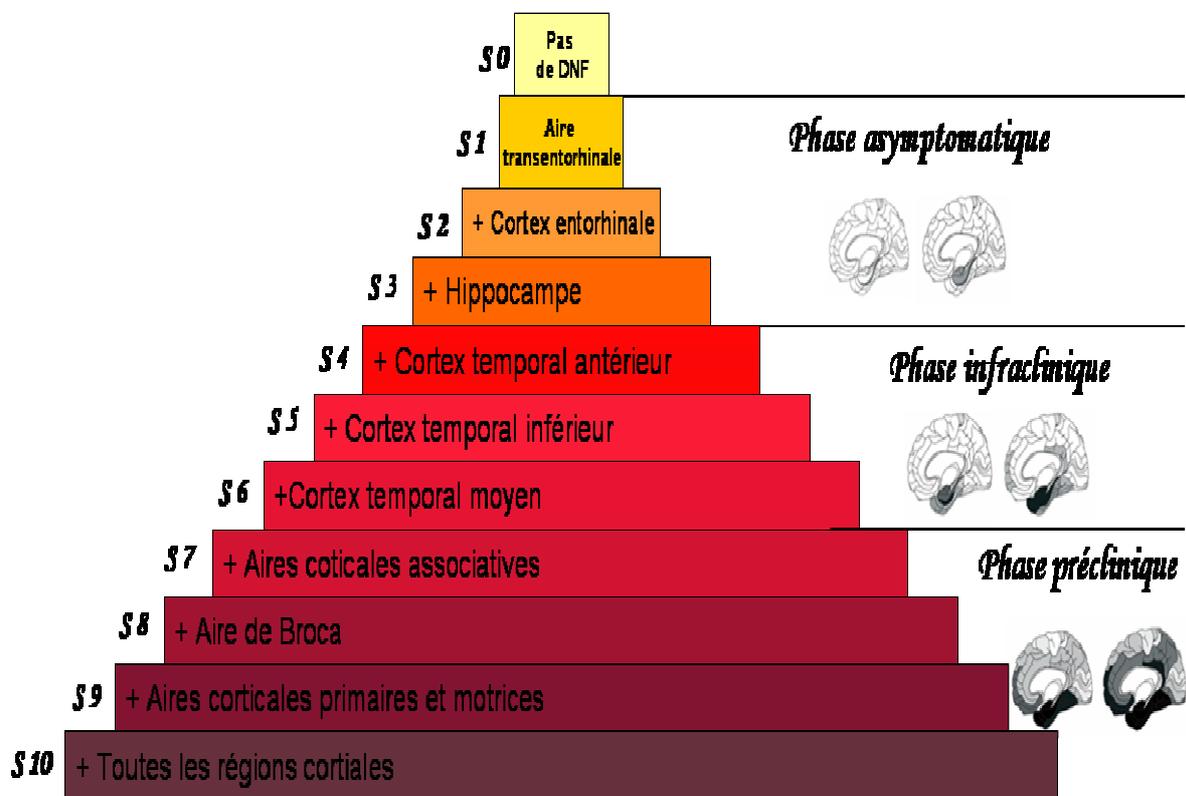
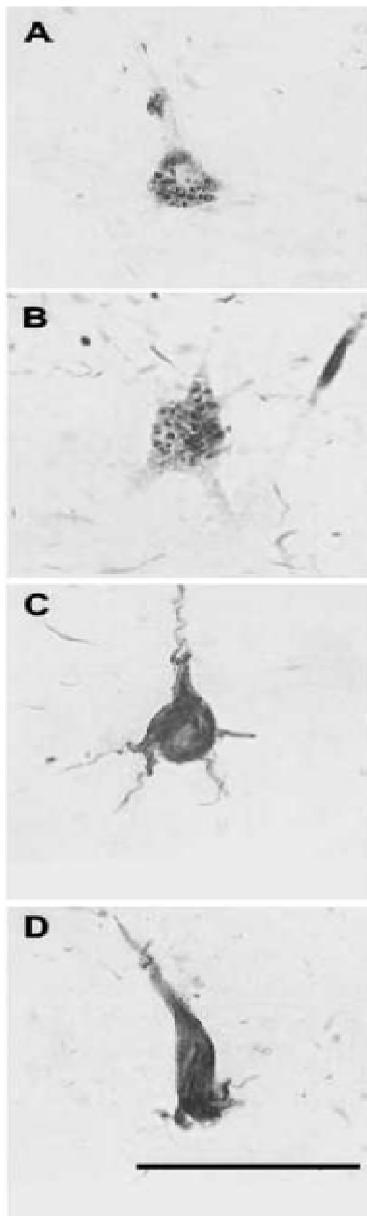


Figure 7 : Progression de la dégénérescence neurofibrillaire au cours de la MA.

1.3.2 Progression cytologique

Nous avons vu que la protéine Tau dans les neurones de patients atteints de MA s'accumulait majoritairement dans le corps cellulaire mais aussi dans les dendrites. Par contre, dans des neurones sains, elle est localisée dans les axones. Cette évolution de l'agrégation de la protéine (Figure 8) est corrélée avec la

présence de sites de phosphorylation spécifiques, qui peuvent être classés comme précoces ou tardifs. Sur l'échelle de la progression de la maladie, ces sites de phosphorylation sont révélés par un grand nombre d'anticorps phosphodépendants. La sévérité de la DNF peut être évaluée et classée en trois stades distincts (Augustinack et al 2002):



Degré de phosphorylation

Précoce : les enchevêtrements pré-neurofibrillaires (pre-neurofibrillary tangles) (preNFT)

Le noyau du neurone est détectable et la morphologie générale de la cellule apparaît normale. Le cytoplasme contient des protéines Tau phosphorylées à l'aspect diffus. Les dendrites sont eux préservées (Figure 8A/B).

Intermédiaire : les enchevêtrements pré-neurofibrillaires intra-neuronaux (intra-neuronal neurofibrillary tangles) (iNFT)

Ils contiennent des structures filamenteuses agrégées qui occupent une place importante dans le cytoplasme. Le noyau est présent mais fréquemment déplacé par des inclusions. Les dendrites apparaissent détériorées (Figure 8C).

Final : les enchevêtrements neurofibrillaires extra-neuronaux (intra-neuronal neurofibrillary tangles) (eNFT)

Dans les eNFTs, les agrégats fibrillaires de Tau sont localisés à l'extérieur de la cellule

« fantôme ». Ni le noyau ni le cytoplasme ne sont identifiables, tandis que les dendrites sont désorganisées voir absentes. (Figure 8D).

Figure 8 : Formation d'agrégats fibrillaires (d'après Augustinack et al 2002).

Ceci signifie qu'il y aurait une phosphorylation séquentielle de Tau en fonction du stade de la maladie. La relation entre phosphorylations spécifiques et évènements moléculaires qui conduisent à l'agrégation de plus en plus massive de la protéine n'est pas connue. Il est proposé entre autres que la phosphorylation conduirait à des changements conformationnels de la protéine qui pourraient affecter ses capacités fonctionnelles et sa sensibilité à l'agrégation.

1.3.3 Différents types de filaments

Ces dépôts neurofibrillaires (neurofibrillary tangles NFT) sont constitués de protéine Tau anormalement phosphorylée et se divisent en deux types de structures filamenteuses : les filaments appariés en hélice (paired helical filaments PHF) et les filaments droits (straight filaments SF).

Une étude réalisée par Yoji Itoh et collaborateurs (Itoh et al 1997) en microscopie électronique détaille les structures tridimensionnelles de NFTs issus de cellules nerveuses d'un patient souffrant de la maladie d'Alzheimer. Ces NFTs ont été clairement définis dans la périphérie du corps cellulaire neuronal.

Les SF mesurent de 20 à 25 nm de diamètre, sont légèrement courbés et possèdent une surface lisse. La plupart du temps, ils sont disposés parallèlement les uns aux autres mais peuvent également s'apparier au hasard (Figure 9). Ils sont localisés dans le cytoplasme des cellules nerveuses.

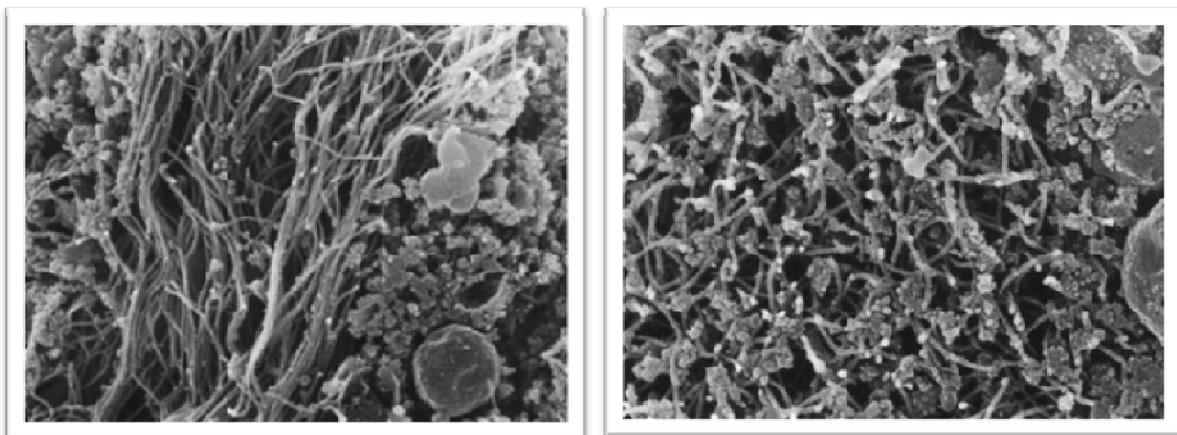


Figure 9 : Images de microscopie électronique de *straight filaments* disposés parallèlement (à gauche) et arrangés au hasard (à droite).

Un deuxième type de filaments possédant une structure en hélice, les paired helical filaments, est également présent dans le cytoplasme des cellules nerveuses (Figure 10).

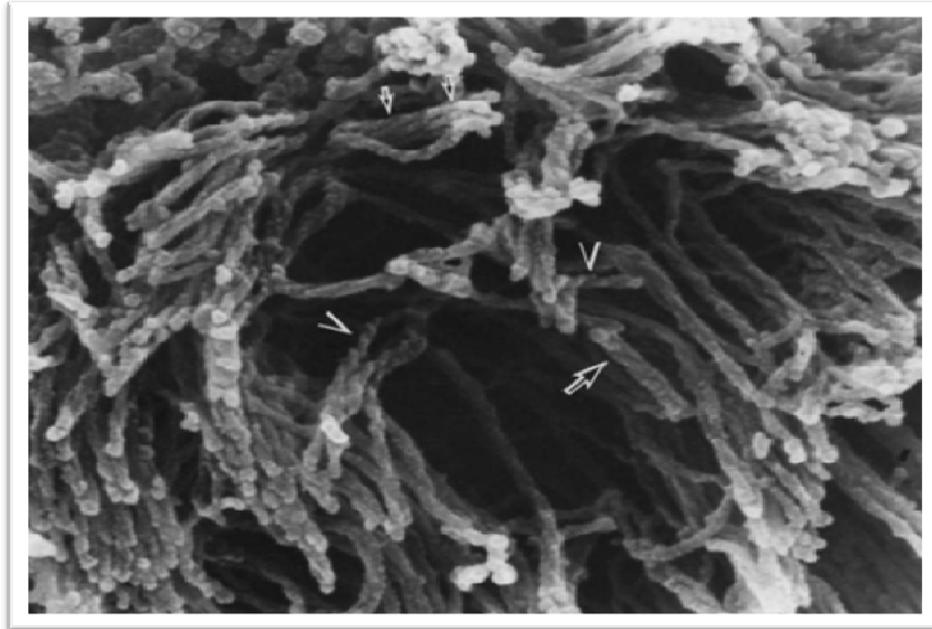


Figure 10 : Images de microscopie électronique de PHFs (d'après Itoh et al 1997).

Les PHFs font penser à un ruban torsadé ou encore à une corde enroulée sur elle-même et leur diamètre varie d'un filament à un autre. Cependant la plupart d'entre eux, mesure 28 nm de diamètre et présente une distance de 80-100 nm entre chaque constriction périodique.

Des structures enroulées similaires à celle des PHFs sont également retrouvées dans la paralysie supranucléaire progressive (Probst et al 1988), la dégénération corticobasale et la maladie de Pick. Néanmoins les constriction régulières des PHFs de la MA sont plus courtes que dans les autres pathologies précédemment citées. Enfin, on peut rappeler que Kidd avait initialement décrit ces PHFs (Kidd et al 1963): il avait caractérisé par microscopie électronique des filaments possédant une hélicité droite et constitués de deux « rubans » individuels.

2. La protéine Tau

2.1 Structures de la protéine Tau

D'un point de vue général, les protéines Tau sont solubles, thermostables et ne présentent pas de conformation tridimensionnelle particulière (Lee et al 1988, Schweers et al 1994).

Le gène humain de Tau (*MAPT*) est situé sur le chromosome 17 au locus 17q21. Il est composé de 16 exons dont 14 sont codants (Andreadis et al 1992) (Figure 11). Ce gène est principalement exprimé dans les neurones du système nerveux central, mais également, dans une moindre mesure, dans les muscles, le cœur, les reins et les testicules (Gu et al 1996). Le transcrit primaire subit un épissage alternatif complexe, régulé de façon tissu-spécifique au cours du développement.

Dans le cerveau adulte, en fonction du transcrit, l'isoforme exprimée va varier de 352 à 441 acides aminés et aura une masse moléculaire comprise entre 45 et 65 kDa (Buee et al 2000). Tau peut être considérée comme une protéine dipolaire tant au niveau structural que fonctionnel. En effet, on distingue une région amino-terminale chargée négativement, également appelé « domaine de projection » et une région carboxy-terminale chargée positivement, également appelé « domaine de liaison aux microtubules » (MTBR) (Figure 11).

La région amino-terminale de Tau est appelée domaine de projection car elle se « projette » depuis les microtubules vers l'extérieur de ces derniers. Ce domaine, très acide, est constitué des exons 1 à 4, mais peut varier de taille selon l'inclusion ou non des exons 2 (29 AA) et 3 (29 AA). L'extrémité libre de Tau, permet l'interaction avec des protéines membranaires et cytosquelettiques (Hirokawa et al 1988); (Brandt et al 1995).

Au niveau de sa région carboxy-terminale, la protéine Tau peut présenter trois ou quatre domaines de fixation aux microtubules (3R ou 4R) (Figure 11 ; R1, R2, R3, R4). La présence du quatrième domaine de liaison aux microtubules est déterminée par l'inclusion de l'exon 10, renforçant alors la liaison aux microtubules (Goedert & Jakes 1990); (Scott et al 1991); (Litersky et al 1993); (Butner & Kirschner 1991). Ce domaine, constitué des exons 9 à 12, est très basique.

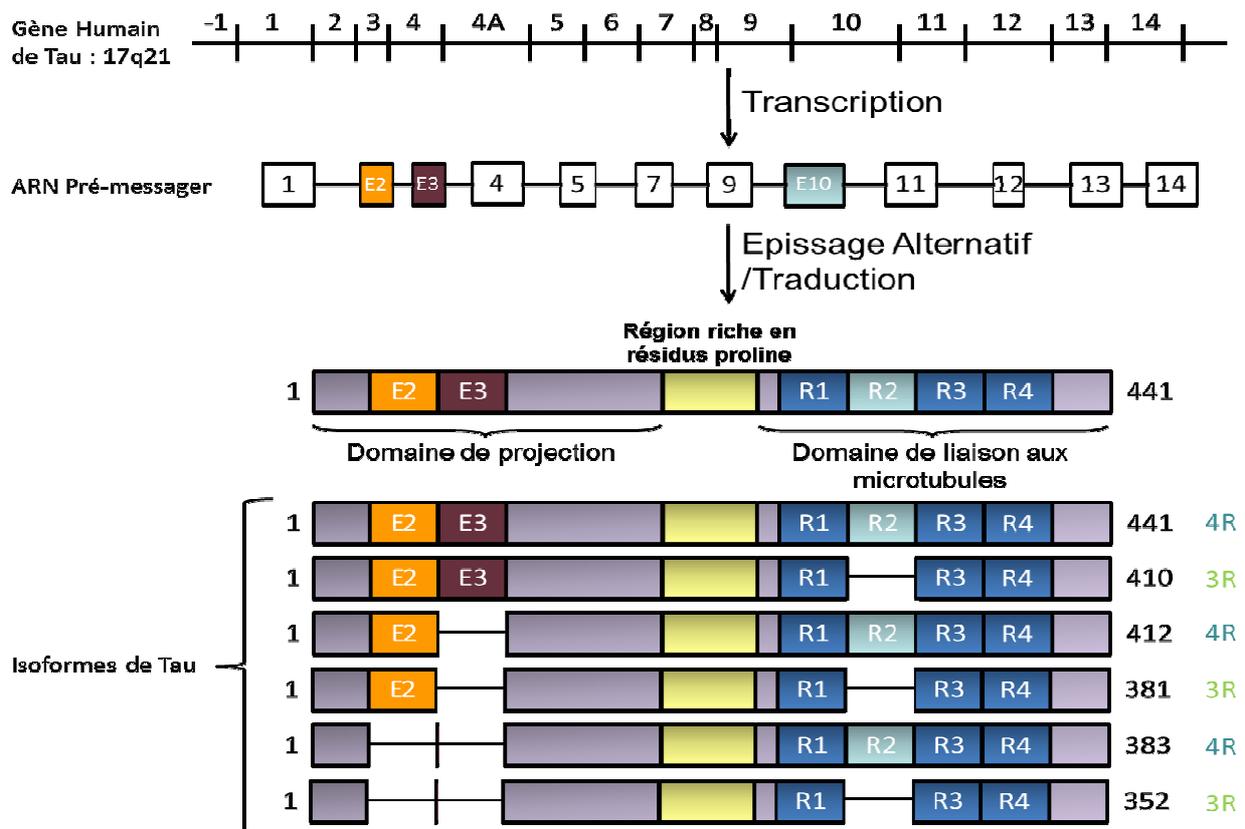


Figure 11 : Représentation du gène de la protéine Tau, de son transcrit et de ses différents isoformes de Tau.

L'hétérogénéité de la protéine Tau chez l'Homme provient non seulement de l'épissage alternatif des transcrits mais également des modifications post-traductionnelles que subit la protéine Tau au cours du développement (Buee et al. 2000).

2.2 Modifications post-traductionnelles de la protéine Tau

2.2.1 Glycosylation

Les protéines Tau sont susceptibles d'être glycosylées. Soit une O-glycosylation qui correspond à l'addition d'une N-acétylglucosamine (O-GlcNac) sur des sérines et thréonines en position n-1 par rapport à des prolines en position n (sites Ser-Pro ou Thr-Pro) (Lefebvre et al 2003) (Arnold et al 1996). Puisque les sites impliqués dans cette modification post-traductionnelle sont les mêmes que pour la phosphorylation, il est admis que cette modification agirait sur Tau de façon antagoniste à la phosphorylation, les deux modifications étant exclusives l'une de l'autre (Zachara et al 2002). Lors d'une tauopathie, nous pouvons également observer une N-glycosylation, qui correspond à l'ajout de groupements N-glycosylés permettant de maintenir la structure en hélice des PHF et de faciliter la phosphorylation de la protéine en favorisant la reconnaissance par certaines kinases, dont CDK2 (Griffith & Schmitz 1995). L'effet induit par les N-glycosylations précéderait et faciliterait le processus d'hyperphosphorylation de façon site spécifique ainsi que l'agrégation de Tau dans le cadre des pathologies neurodégénératives (Takahashi et al 1999).

2.2.2 Phosphorylation

La modification post-traductionnelle majeure des protéines Tau est la phosphorylation (Grundke-Iqbal et al 1986). Ce phénomène physiologique est régulé selon le stade de développement et suivant les isoformes de Tau (Stoothoff & Johnson 2005) (Figure 12). En effet, la protéine Tau est une phosphoprotéine qui possède 85 sites potentiels de phosphorylation (35 résidus Thr, 45 résidus Ser et 5 résidus Tyr) sur l'isoforme la plus longue (Goedert et al 1989). Sur cette isoforme, 45 sites ont déjà été décrits comme étant phosphorylés (Hanger et al 2009) et la plupart de ces sites se situent à proximité du domaine riche en proline et dans le domaine de liaison aux microtubules.

						Nombre de Sérines	Nombre de Thréonines	Nombre de Tyrosines	Sites potentiellement phosphorylables
1		441	4R	45	35	5	85		
1		410	3R	41	35	5	81		
1		412	4R	45	31	5	81		
1		381	3R	41	31	5	77		
1		383	4R	40	26	5	71		
1		352	3R	36	26	5	67		

Figure 12 : Répartition des sites de phosphorylation en fonction des isoformes de Tau.

De nombreuses kinases et phosphatases régulent la phosphorylation/déphosphorylation de la protéine Tau. Parmi les kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau, nous pouvons citer la famille des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), les CDK2 et 5 (Cyclin Dependant Kinases) et les GSK-3 α et β (Glycogen Synthase Kinase 3 α et β) qui phosphorylent les sites sérine et thréonine de Tau. Les sites tyrosine pourront quant à eux être phosphorylés par des protéines de type tyrosine kinase de la famille Src, telles que la protéine Fyn (Lee et al 2004); (Derkinderen et al 2005).

La régulation de la déphosphorylation de Tau est le plus souvent assurée par les phosphatases endogènes du cerveau, tel que PP1, PP2A et PP2B appartenant à la famille des calcineurines et la phosphatase PP5 (Gong et al 1994, Gong et al 2004, Kins et al 2001). De par son expression importante dans le cerveau, PP2A est considérée comme la phosphatase principale de Tau (Goedert et al 1995); (Liu et al 2005).

L'action conjuguée de ces kinases et phosphatases va par conséquent réguler la liaison de Tau aux microtubules et par là même sa fonction de stabilisation de ces derniers.

3. Fonctions de la protéine Tau

3.1 Stabilisation des microtubules

La protéine Tau fait partie de la famille des protéines MAPs (Microtubules Associated Proteins). L'interaction de la protéine Tau se fait à l'aide des domaines de liaison aux microtubules 3R ou 4R et à la région riche en prolines. La protéine Tau possède la propriété de s'associer à la surface chargée négativement des microtubules, dont elle favorise l'assemblage et la stabilité, nécessaire au transport axonal (Mukrasch et al 2007, Weingarten et al 1975). Les microtubules sont des constituants du cytosquelette neuronal, dont la formation repose sur l'association d'hétérodimères de tubuline (α et β) sous forme de structures appelées protofilaments. Les 13 protofilaments constitués s'associent entre eux pour former les structures cylindriques de 25nm de diamètre, que sont les microtubules. De plus les microtubules sont des polymères polarisés, ils présentent une extrémité « moins » orientée vers le centre organisateur des microtubules et une extrémité « plus » orientée vers la périphérie de la cellule. L'extrémité plus est nommée ainsi car elle présente une vitesse d'assemblage des dimères de tubuline plus élevée (Figure 13).

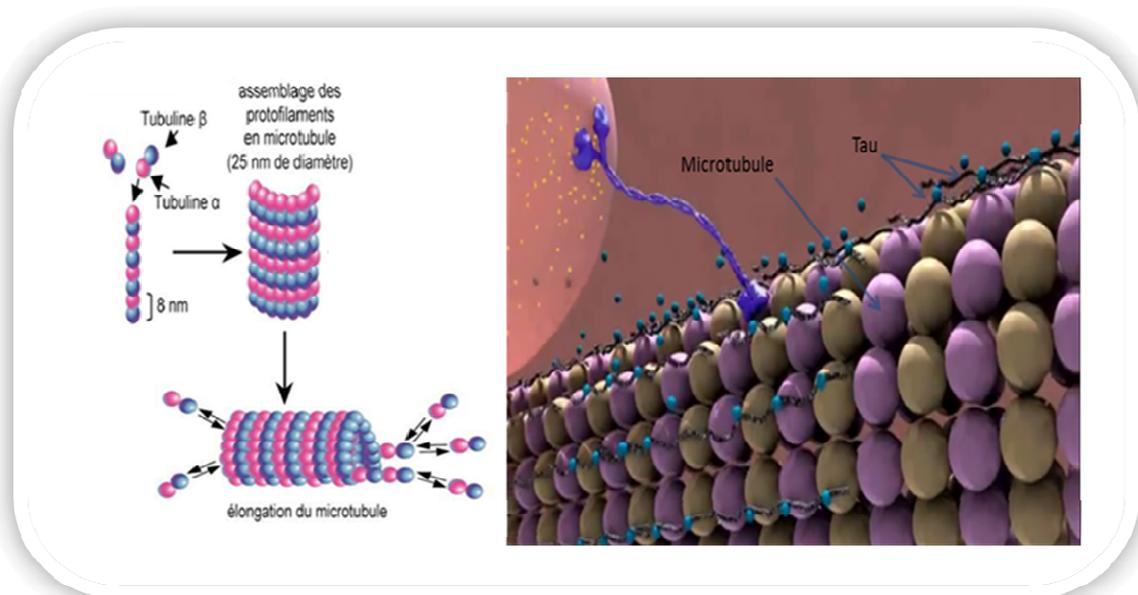


Figure 13 : Formation des microtubules et fixation de la protéine Tau.

3.2 Transport Axonal

La distance entre le corps cellulaire et la synapse rend indispensable la présence d'un transport axonal bidirectionnel, pour la survie neuronal. Ce transport s'effectue grâce à des moteurs moléculaires, appelés kinésine et dynéine, qui circulent le long des « rails » que constituent les microtubules. Ces MAPs assureront respectivement les transports rétrograde (de la synapse vers le corps cellulaire) et antérograde (du corps cellulaire vers la synapse) d'organites et autres vésicules cellulaires (Hirokawa et al 1991); (Paschal & Vallee 1987) (Figure 14).

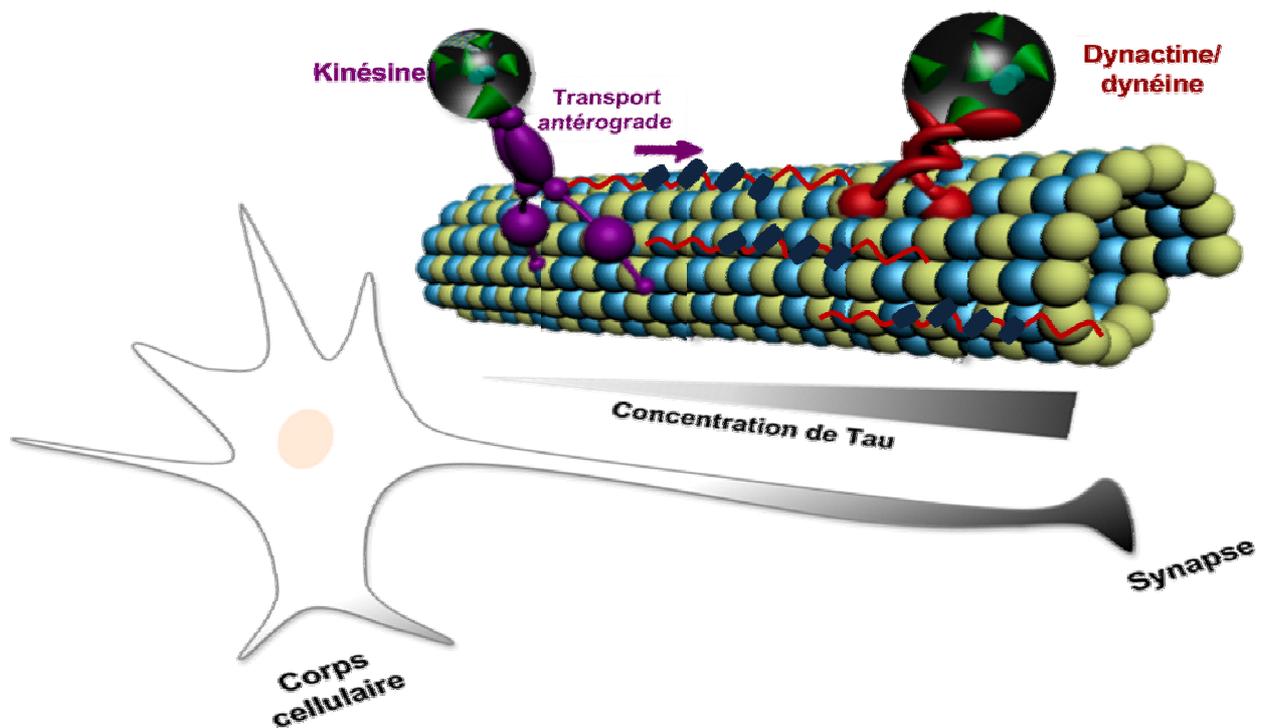


Figure 14 : Tau et transport axonal.

La fixation de Tau à la surface des microtubules est nécessaire pour le bon déroulement du transport axonal, car elle permet la stabilisation du réseau microtubulaire et la régulation de l'activité des protéines motrices (Dynéine et

Kinésine) (Sutton & Schuman 2005); (Magnani et al 2007); (Cuchillo-Ibanez et al 2008). En interagissant avec la kinésine 1 (Cuchillo-Ibanez et al 2008, Utton et al 2005), Tau modulerait la fréquence d'attachement de celle-ci aux microtubules (Trinczek et al 1999). Tau n'influence pas la vitesse du transport axonal assuré par la kinésine mais inhibe son recrutement aux microtubules. Cet effet serait dépendant du domaine de liaison aux microtubules de Tau et régulé par le caractère plus ou moins acide de son domaine de projection (Dixit et al 2008). Le domaine de projection de Tau est acide, il mimerait les dimères de tubulines (également acides) et renforcerait l'interaction entre Tau et la kinésine (Dixit et al 2008). De même, Tau interagit également avec le complexe dynéine/dynactine (Magnani et al 2007). Or, contrairement à l'interaction entre Tau et la kinésine 1, celle entre Tau et la dynéine ne modulerait pas l'affinité du complexe moteur pour le réseau microtubulaire (Dixit et al 2008).

4. Agrégation et formation de PHFs

Comme nous avons pu le voir ci-dessus, les protéines Tau sont des phosphoprotéines associées aux microtubules et leurs degrés de phosphorylation jouent un rôle très important dans la stabilisation et le transport axonal. L'agrégation de Tau sous forme de DNF est un phénomène pathologique commun à la MA et à une vingtaine d'autres maladies neurodégénératives. La découverte de mutations sur le gène de Tau conduisant à son agrégation dans la DFTN-17 a montré l'importance de la dérégulation de Tau dans les phénomènes de neurodégénérescence (Spillantini & Goedert 1998).

4.1 Phosphorylation pathologique de la protéine Tau

Dans les Tauopathies, des études biochimiques ont permis de mettre en évidence une altération de la phosphorylation de Tau dans les agrégats. Dans un état de phosphorylation normale, chaque molécule de Tau présente en moyenne 2 à 3 groupements phosphate. Cependant, dans le cerveau des patients atteints de MA, la protéine Tau est hyperphosphorylée avec 3 à 4 fois plus de groupements phosphate (Kopke et al 1993, Ksiezak-Reding et al 1992). Les protéines

hyperphosphorylées se détacheraient des microtubules, changeraient de conformation et s'assembleraient en formant dans un premier temps des dimères, puis des oligomères, et finalement des agrégats insolubles (Kuret et al 2005, Maeda et al 2006).

De plus, les protéines Tau peuvent être anormalement phosphorylées puisqu'il existe des sites de phosphorylation spécifiques aux protéines Tau présents dans les PHF (Buee & Delacourte 2006) : le site Thr231 reconnu par l'anticorps TG3, le site Thr212/Ser214 reconnu par l'anticorps AT100. Néanmoins, les sites anormalement phosphorylés ne sont pas toujours tous identiques.

A l'échelle moléculaire, les agrégats Tau diffèrent d'une Tauopathie à l'autre par leur composition en isoformes. Cette dernière est visualisée après séparation par électrophorèse monodimensionnelle suivie d'un marquage dirigé spécifiquement contre les exons alternatifs 2, 3 et 10, et les formes anormalement phosphorylées de Tau. Il en résulte une classification biochimique (Figure 15), comprenant 4 classes, basée sur la composition en isoformes des agrégats Tau : c'est le code barre des tauopathies (Sergeant et al 2005).

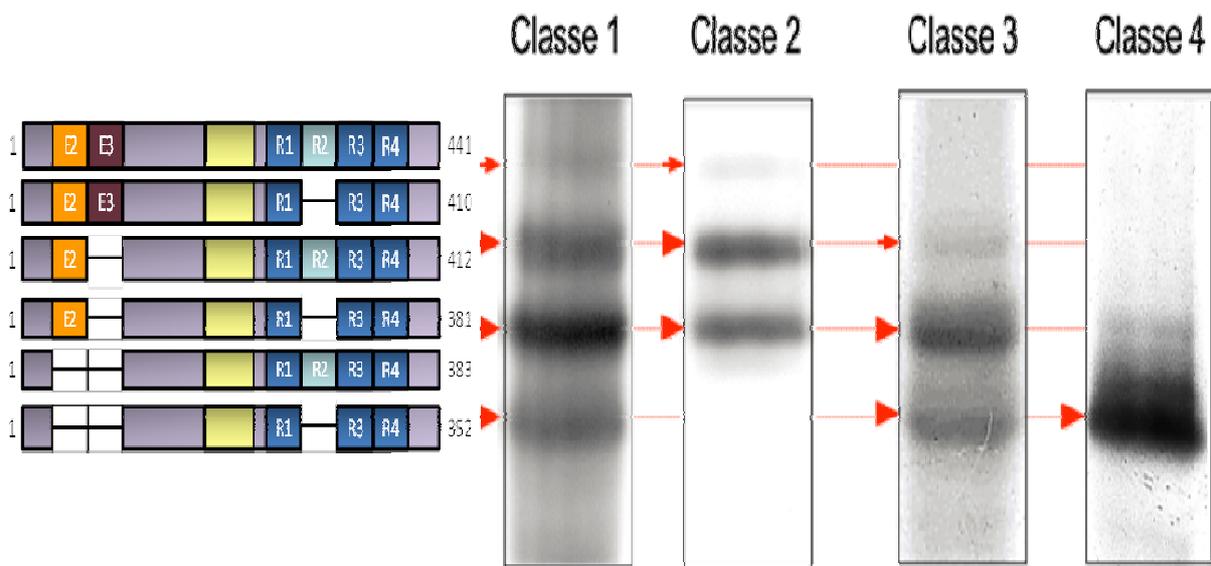


Figure 15 : Isoformes des protéines Tau et mobilité électrophorétique (d'après Sergeant et al 2005)

➤ **Classe I** : agrégation de toutes les isoformes de Tau

Dans les tissus cérébraux de patients décédés de la MA, les protéines Tau isolées des PHF possèdent un profil électrophorétique différent des protéines Tau isolées de patient sain. Cette différence est due à la présence de 3 sous-espèces majoritaires de protéines Tau de masse moléculaire apparente 60, 64 et 69 kDa et une espèce minoritaire de 72 kDa. La forme de 60 kDa correspond à l'isoforme foétale (2-3-10-) phosphorylée, celle de 64 kDa aux isoformes (2+3-10-) et (2-3-10+) phosphorylées, et la forme de 69 kDa aux isoformes (2+3+10-) et (2+3-10+) phosphorylées. La phosphorylation de l'isoforme la plus longue (2+3+10+) conduit à l'apparition de l'espèce minoritaire de 72 kDa. Ainsi, les PHF contiennent l'ensemble des 6 isoformes Tau hyperphosphorylées (Brandt et al 2005, Mulot et al 1994).

Ce profil biochimique est également caractéristique du syndrome de Down (ou trisomie 21), de l'Ile de Guam et de la maladie de Parkinson.

➤ **Classe II** : agrégation des isoformes incluant l'exon 10

Le profil électrophorétique de la classe 2 se caractérise par un doublet pathologique migrant à 64kDa et 69kDa. Ces bandes correspondent aux isoformes hyper et anormalement phosphorylées incluant l'exon 10. Ce profil biochimique est caractéristique des DCB, PSP (dégénérescence cortico-basale, paralysie supranucléaire progressive) et de certaines DFTP-17.

➤ **Classe III** : agrégation des isoformes excluant l'exon 10

La classe 3 regroupe certaines formes de DFTP17 et la maladie de Pick. Elle se caractérise par un profil biochimique représenté par deux bandes à 60 et 64kDa correspondant aux isoformes excluant l'exon 10 (Delacourte et al 1996).

➤ **Classe IV** : agrégation principalement de l'isoformes excluant les exons 2, 3 et 10.

La classe 4 regroupe les tauopathies caractérisées par un profil biochimique d'une bande à 60kDa. Elle regroupe les dystrophies myotoniques de type 1 et 2.

Par exemple, la phosphorylation des sites Ser262/Ser356 est observée dans de nombreuses maladies comme la MA et les cas de DFTP-17 mais est absente dans les inclusions de la maladie de Pick (Probst et al 1996). La Ser262 est localisée dans la région R1 du domaine MTBR (microtubule binding region) qui est considérée comme étant le domaine de liaison de Tau aux microtubules ainsi que celui de l'auto-assemblage de Tau (Ksiezak-Reding & Yen 1991, Wille et al 1992) (Figure 16).

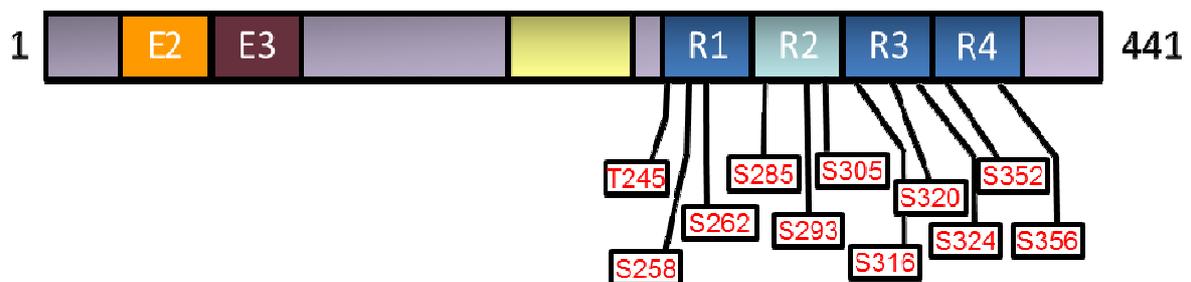


Figure 16 : Sites de phosphorylation au niveau du domaine MTBR.

Par opposition à la phosphorylation de Tau sur des sites situés en région amino- et carboxy-termini et flanquant cette région MTB, la phosphorylation de Tau sur la Ser262 abolit la liaison de Tau aux MTs affectant ainsi leur stabilité (Drewes et al 1997, Drewes et al 1995). De plus, la Ser262 est hautement phosphorylée sur la Tau-PHF alors qu'elle n'est que moyennement phosphorylée sur la Tau adulte normale ainsi que sur la Tau fœtale (Morishima-Kawashima et al 1995, Seubert et al 1995). Ce site de phosphorylation jouerait un rôle important dans le processus neurodégénératif car la combinaison des sites de phosphorylation Thr212 Thr231 et Ser262 provoque une toxicité neuronale de la protéine Tau en déstabilisant les microtubules (Alonso et al 2010), alors que la phosphorylation simultanée des ser214 et ser262 empêche l'agrégation *in vitro* (Schneider et al 1999).

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine Tau se lie et stabilise les MTs, permettant ainsi le transport axonal des vésicules et des organelles par les protéines moteurs (Mandelkow & Mandelkow 1998). La phosphorylation accrue de Tau sur de multiples sites, semble être un des marqueurs précoces de la maladie d'Alzheimer, qui serait suivie par une agrégation anormale de Tau en fibrilles (Chin et al 2000, Matenia & Mandelkow 2009) (Figure 17).

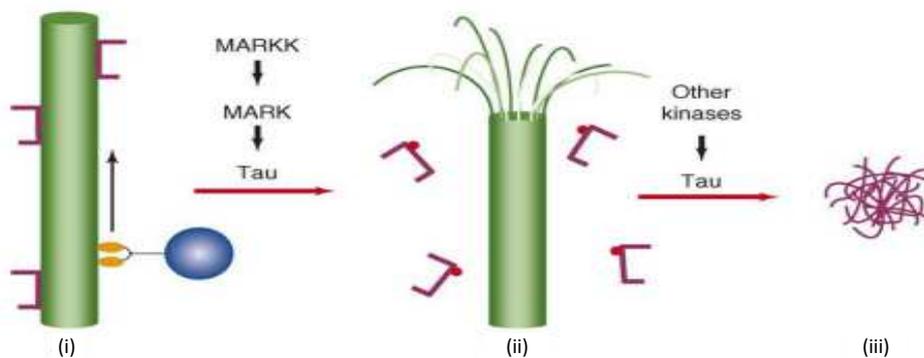


Figure 17 : Voies pathologiques de la neurodégénération impliquant la kinase MARK et la protéine Tau (Matenia et al 2009).

- (i) Dans un axone normal, les microtubules (en vert) forment les rails pour le transport des vésicules par les moteurs moléculaires (sphère bleue et jaunes) et sont stabilisés par la protéine Tau (en violet).
- (ii) La phosphorylation de Tau (points rouges) par MARK peut entraîner un détachement des protéines Tau et donc une déstabilisation et un désassemblage des MTs.
- (iii) Dans la situation pathologique de la MA, sous l'effet de nombreuses kinases, Tau devient hyperphosphorylée et s'agrège en PHFs insolubles menant ainsi à une perte synaptique et neuronale.

En résumé, le degré de phosphorylation de la protéine Tau semble dépendre de l'équilibre entre plusieurs kinases et phosphatases. L'hyperphosphorylation et la phosphorylation pathologique de la protéine Tau suffisent pour modifier ses propriétés fonctionnelles : en diminuant l'affinité de la protéine pour les microtubules et en empêchant la formation de celles-ci (Cuchillo-Ibanez et al 2008, Dubey et al 2008, Konzack et al 2007). Alonso et coll. (Alonso et al 1994) ont démontré *in vitro*, que les isoformes phosphorylées se lient aux protéines Tau normales au niveau de leur région de fixation aux microtubules, formant ainsi des amas fibrillaires intraneuronaux (Alonso et al 1996), (Sato et al 2002) (Mandelkow et al 2003). Donc, la phosphorylation de Tau pourrait être la première étape dans les processus d'agrégation. En effet, la déphosphorylation par les phosphatases PP2A et PP2B des protéines Tau hyperphosphorylées inhibe leur polymérisation en filaments (Wang et al 2007a) et restaure leurs fonctions biologiques (Wang et al 1995) (Figure 18).

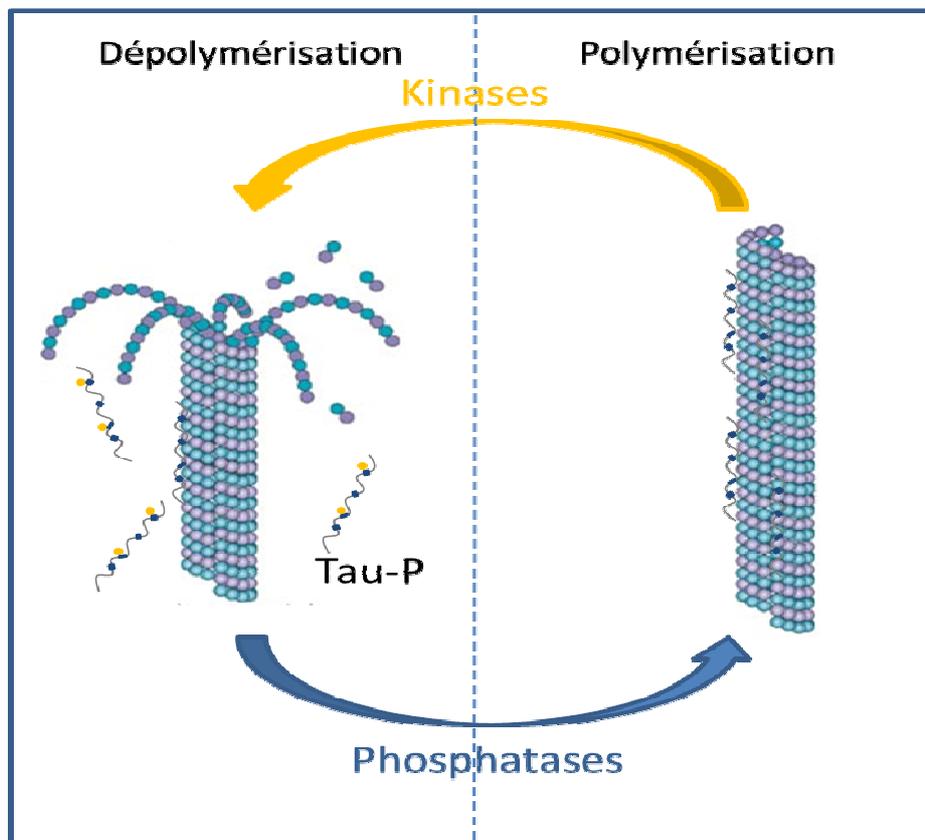


Figure 18 : Equilibre entre kinases et phosphatases.

4.2 Importance des PHF6 et 6*

Bien que la protéine Tau monomérique ne soit pas structurée en solution (Schweers et al 1994), différentes régions ont été récemment impliquées dans la formation de structures secondaires en feuillet β lors de l'agrégation sous forme de PHF (von Bergen et al 2005).

La région C-terminale, appelée domaine de liaison au Microtubules, est constituée de 4 séquences répétitives de liaison R1 à R4 (Figure 11) nécessaires à l'ancrage de la protéine Tau. L'épissage alternatif de l'exon 10 entraîne la perte de R2 au sein du domaine de liaison. L'isoforme résultant de cet épissage ne présente plus que 3 points d'ancrage aux microtubules (Tau3R) (Figure 19A). Des études ont montré que les isoformes à 4 séquences (Tau4R) de liaison lient et polymérisent mieux les microtubules (Goedert & Jakes 1990) (Panda et al 2003) (Figure 19B).

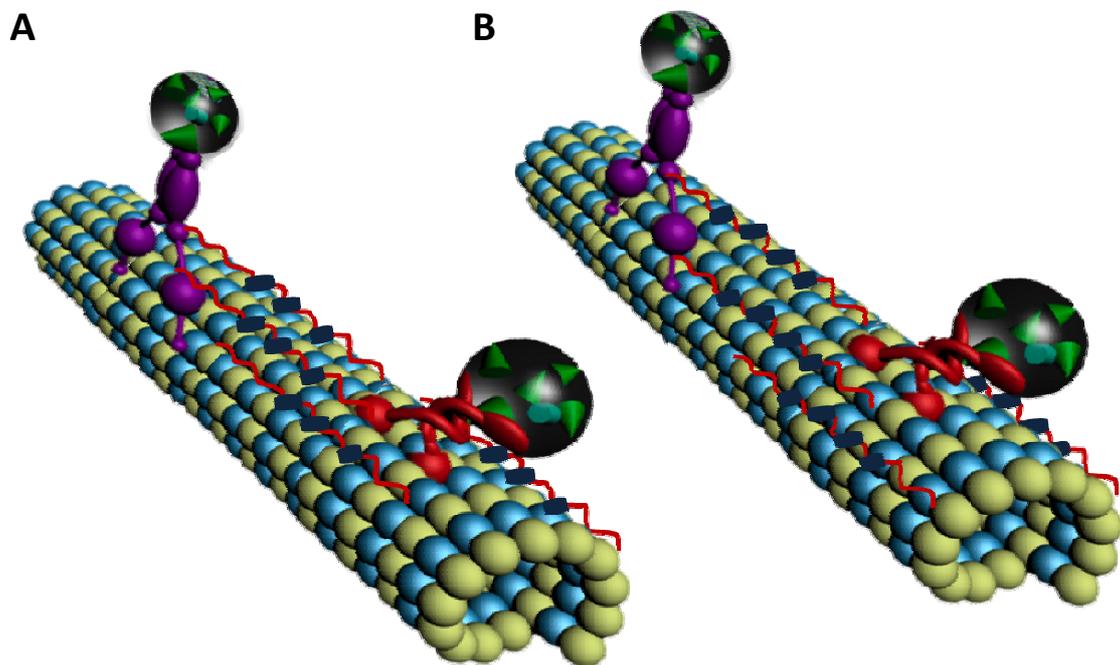


Figure 19 : Les points d'ancrages de la protéine Tau en fonction de l'isoformes (A : Tau 3R et B : Tau 4R).

La région des domaines de liaison aux microtubules est localisée au cœur des filaments (Wischik et al 1988) (Jakes et al 1991), et les domaines R2 et R3 jouent un rôle primordial dans le processus d'agrégation (Amos 2004, DeTure et al 2002). En 2000, les études de von Bergen et coll. ont permis d'identifier un hexapeptide PHF6 306VQIVYK311 au début du domaine R3. Cette séquence peptidique pourrait adopter lors de l'agrégation une conformation en feuillet β qui constituerait un noyau de nucléation facilitant la formation des PHF (Figure 20) (von Bergen et al 2000). En 2001, la même équipe a découvert un autre hexapeptide PHF6* 275VQIINK280, au début du domaine R2 (von Bergen et al 2001), également capable de former des filaments en feuillet β . L'hexapeptide PHF6 a été découvert avant PHF6* car les premières expériences de digestion protéolytique ont été réalisées sur un isoforme de Tau ne contenant pas le domaine R2.

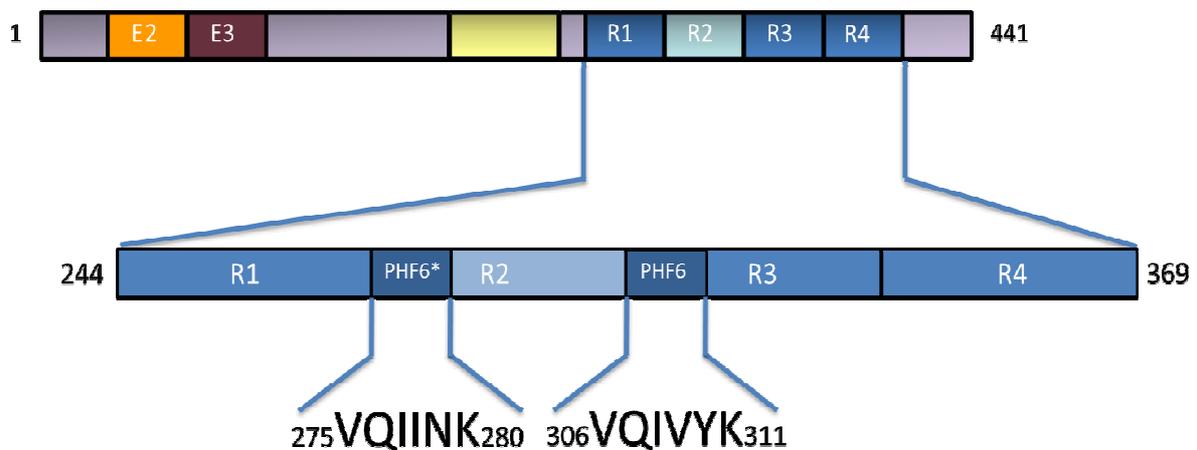


Figure 20 : Localisation et séquence des PHF6* et 6.

L'hyperphosphorylation des résidus Ser262, Ser293 et Ser324 situés dans les domaines de liaison des microtubules va provoquer le détachement de la protéine Tau des microtubules (Wischik et al 1988) (Jakes et al 1991).

De plus, de nombreuses mutations pathologiques existent au niveau des domaines de liaison aux microtubules R2 et R3. A ce jour, 15 mutations ont été

identifiées au niveau du domaine R2, tel que $\Delta K280$ et P301L (<http://www.molgen.ua.ac.be/FTDmutations/>) (Figure 21).

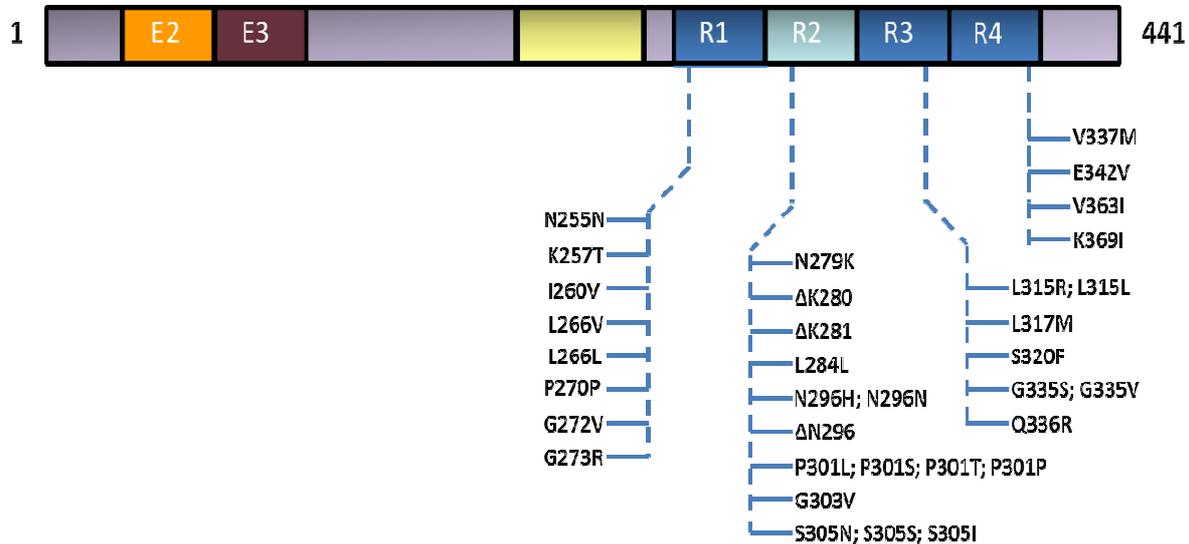


Figure 21 : Localisation des mutations au sein du MTBR.

Dans le cas de DFTP-17, la mutation par délétion de la lysine en 280, $\Delta K280$, entraîne la formation de filaments en feuillet β . *In vitro*, elle permet l'agrégation du domaine de liaison en quelques heures et sans cofacteurs polyanioniques (Héparine, ARN...), généralement utilisés pour provoquer l'agrégation (Barghorn et al 2000, von Bergen et al 2001). La mutation $\Delta K280$ entraîne une augmentation du nombre de transcrits Tau3R par rapport à Tau4R (D'Souza et al 1999).

Au contraire, lorsque les isoformes Tau4R présentent une mutation non-sens P301L (ou P301S), au niveau du domaine de liaison R2, le nombre de transcrits Tau4R est supérieur aux transcrits Tau3R (Poorkaj et al 1998). Ces isoformes mutés s'avèrent perdre leur capacité de liaison aux microtubules et s'agrègeraient alors pour former des filaments torsadés au sein des neurones et des cellules gliales. Le profil électrophorétique est un doublet de classe II, Tau 64 et 69 (Delacourte & Buee 2000), (Buee et al 2000). Une étude récente de Tau dans

une culture primaire de neurones corticaux a démontré que Tau4R est l'acteur principal de l'oligomérisation (Deshpande et al 2008). Le maintien d'un équilibre entre les différents isoformes de Tau est nécessaire afin d'éviter une neurodégénérescence.

En résumé, les études menées sur l'agrégation de Tau ont démontré que les modifications subies par la protéine Tau, tel que l'hyperphosphorylation ou les mutations génétiques, contribuent à une perte de fonction et un gain de toxicité de celle-ci. Ces modifications provoqueront le détachement de Tau des microtubules, entraînant ainsi leurs déstabilisations et l'accumulation de Tau dans le corps cellulaire sous forme d'oligomères et de filaments fibrillaires (Iqbal et al 2009, Mazanetz & Fischer 2007).

4.3 Importance des Cystéines 291 et 322 dans la formation de PHFs

Le changement de conformation en feuillet beta des hexapeptides PHF6* et PHF6 lors de l'agrégation explique leur caractère amyloïdogène, leur résistance à la digestion protéolytique et la fixation de la thioflavine S.

L'étude de l'interaction entre les isoformes Tau 3R et 4R a entraîné de nouvelles découvertes concernant la formation de filament de Tau. Deux cystéines semblent jouer un rôle primordial dans le processus d'agrégation, en formant des oligomères par la création de ponts disulfures intermoléculaires. Ces derniers nécessitent les groupements thiols des cystéines présents au niveau du deuxième et troisième domaine de liaison aux microtubules (R2 et R3) (Figure 22) (Schweers et al 1995).

L'isoforme Tau3R ne possède pas le deuxième domaine de liaison R2 et n'est donc pourvue que d'une seule cystéine située au niveau du domaine de liaison R3 (la cystéine 322). Tandis que l'isoforme Tau4R possède deux cystéines, les cystéines 291 et 322.

En 1995, Schweers et coll. ont démontré que l'isoforme Tau3R (K12) agrégeait mieux que Tau4R (K11). Pour cela, ils ont eu recours à 4 fragments de Tau (Figure 22) :

-K12 : représente la région de domaine de liaison aux microtubules avec la cystéine 322 mais sans le domaine R2.

-K12/A322 : représente le fragment K12 avec une mutation non-sens en 322 pour remplacer la cystéine par une alanine.

-K11 : représente la région de domaine de liaison aux microtubules avec la cystéine 322 et la cystéine 291 présente au sein du domaine R2.

-K11/A291 : représente le fragment K11 avec une mutation non-sens en 291 pour remplacer la cystéine par une alanine.

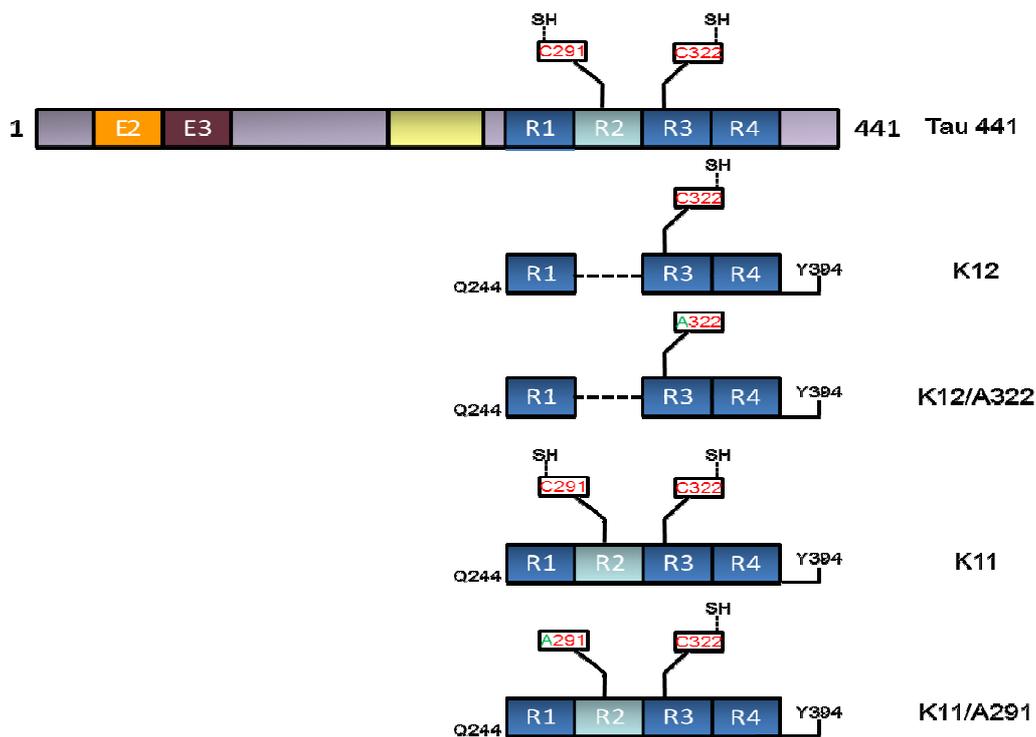


Figure 22 : Représentation de Tau entier et des fragments de Tau utilisés pour tester l'agrégation.

L'agrégation de Tau3R (K12) dépend de la capacité de la Cystéine 322 à former des ponts disulfures intermoléculaires, à favoriser l'oligomérisation de la protéine et l'assemblage en filaments. Si la Cystéine 322 est mutée en Alanine (K12/A322), la protéine Tau ne peut plus former de filaments fibrillaires.

Dans le cas de Tau4R (K11), la présence des Cystéines 291 et 322 provoque la formation d'un pont intramoléculaire, empêchant ainsi une interaction entre deux protéines Tau distinctes. Ceci a été démontré grâce à l'utilisation du mutant K11/A291.

La différence d'agrégation entre le fragment K11 et K12 est donc essentiellement due à la présence de la Cystéine 291 et aux ponts intramoléculaires formés par ces cystéines. Ces ponts intramoléculaires empêcheraient le processus d'agrégation car la formation de dimère n'aurait pas lieu et par le même biais l'étape de nucléation (Friedhoff et al 1998a). Les conditions expérimentales d'agrégation utilisées par Schweers et coll. sont différentes de celles employées actuellement comme nous le verrons par la suite.

4.4 Facteurs impliqués dans l'agrégation de la protéine Tau *in vitro*

Depuis la découverte d'agrégats de Tau dans la neurodégénérescence, de nombreuses études ont essayé de reconstituer le processus d'agrégation *in vitro*, dans l'espoir de comprendre le mécanisme d'agrégation et de découvrir des méthodes pour empêcher ou inverser le processus. Les avancées ont été lentes en raison de deux problèmes : le caractère hydrophile et très soluble de la protéine recombinante Tau (ou Tau isolées de tissu cérébral) entraîne une faible tendance à agréger, rendant ainsi difficile le suivi des étapes de l'agrégation par des

méthodes biochimiques ou spectroscopiques. Des incertitudes subsistent quant à notre capacité de reproduire *in vitro* les agrégats observés dans les cerveaux des patients décédés. Durant la dernière décennie, les problèmes liés à la cinétique et à l'aspect quantitatif de l'agrégation ont été réduits par une combinaison de plusieurs avancées :

- L'ajout de cofacteurs anioniques qui provoquent une accélération de la réaction, comme les polyanions (héparine).
- Un pH optimal pour une meilleure agrégation.
- Une température favorable à une bonne extension des filaments.
- La présence de thiols (-dithiothréitol) (DTT).

4.4.1 L'effet du DTT sur la formation de filament

La plupart des études de polymérisation de Tau réalisées précédemment, suggèrent que des ponts disulfures intermoléculaires formés grâce à la Cys-322 sont importants pour initier l'assemblage de la protéine Tau en filaments. Ces études ont été réalisées avec une version recombinante de Tau sans Cys-291. Il a également été rapporté que la présence de DTT inhibait la formation des PHF (Friedhoff et al 1998b), tandis que la faible agrégation de Tau possédant les 4 domaines de liaison aux microtubules était attribuée à la formation d'un pont intramoléculaire disulfure entre la Cys-291 et Cys-322 (Friedhoff et al 1998a).

La présence de cystéines au sein de la protéine Tau et la formation de ponts disulfures poussa Bhattacharya et ses collègues à définir les meilleures conditions réductrices pour une bonne agrégation de la protéine Tau en présence de DTT.

En 2001, les expériences réalisées par Bhattacharya et coll. montrèrent qu'une faible concentration de DTT ($250\mu\text{M}$ - $500\mu\text{M}$) était suffisante pour entraîner une agrégation de Tau WT plus importante qu'en son absence totale (Bhattacharya et al 2001). La faible concentration en DTT va réduire le pont disulfure intramoléculeire (Cys291-Cys322) pour permettre la formation du pont intermoléculeire (Figure 23). De plus, ils démontrèrent qu'une forte concentration de DTT, à partir d'1mM, empêchait le processus d'agrégation en bloquant la formation de ponts intra et intermoléculeires. Ces résultats suggèrent qu'un pont disulfure intermoléculeire entre soit deux Cys-291 ou Cys-322 est indispensable pour l'agrégation de Tau et que ce pont peut être clivé à des concentrations élevées en DTT ($> 0,50 \text{ mM}$).

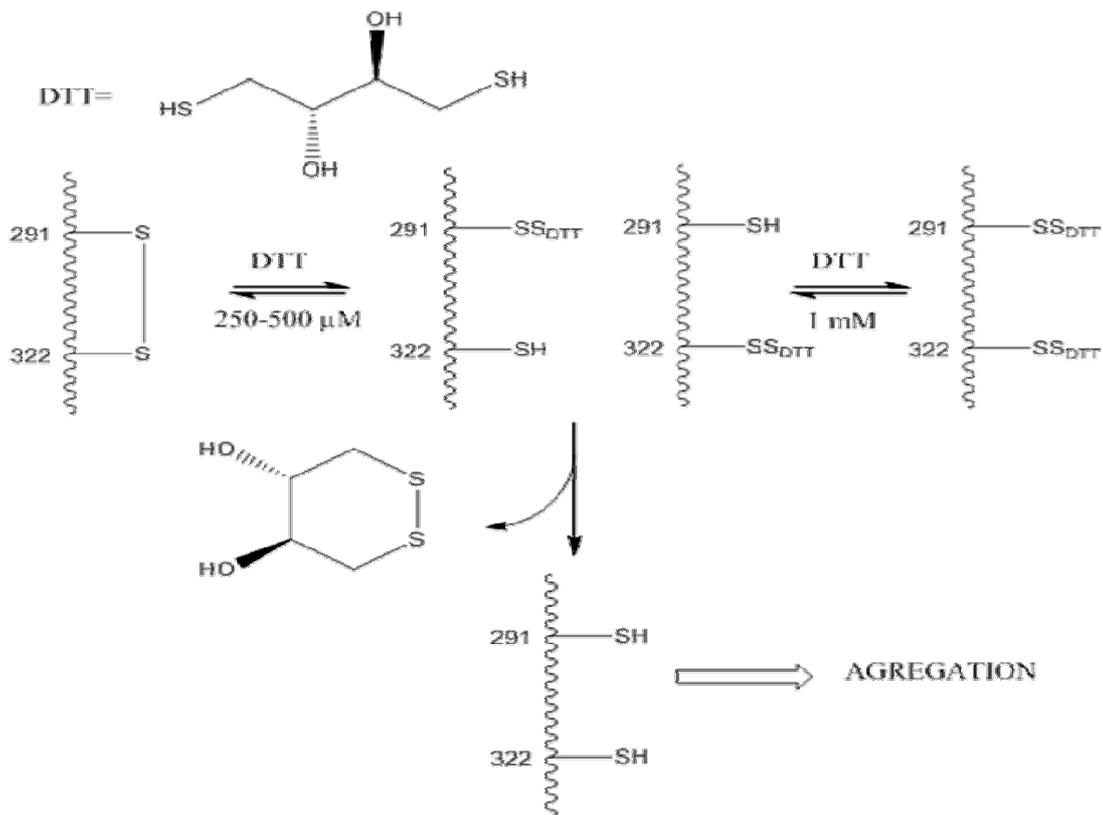


Figure 23 : Effet du DTT sur la formation des ponts inter et intramoléculeires.

Yao et collaborateurs ont prouvé que la présence de DTT était indispensable à une agrégation *in vitro* efficace. En raison de ses propriétés

réductrices, le DTT inhibe généralement la formation de ponts disulfures, et, en conséquence, a un effet négatif sur la formation des filaments, à condition que les ponts disulfures soient la base de l'agrégation. Ce qui semble être le cas pour les mutants de Tau sans Cys-291 (Kampers et al 1996). L'étude réalisée sur Tau4R démontra que l'ajout de DTT provoquerait la rupture des ponts intramoléculaires. Cependant, une forte concentration de DTT empêcherait la formation de ponts intermoléculaires et donc inhiberait l'agrégation (Furukawa et al 2011, Yao et al 2003).

4.4.2 L'implication de l'héparine dans le processus d'agrégation

L'héparine est formée d'une chaîne linéaire polysaccharidique sulfatée et fait partie des glycosaminoglycanes (GAGs). Deux études ont montré que la présence d'un polyanion, tel que l'héparine, facilite la phosphorylation de Tau en modifiant la conformation de Tau d'une manière telle qu'elle pourrait être phosphorylée plus efficacement par les kinases (Moreno et al 1995, Paudel & Li 1999). Par la suite, il a été démontré que l'héparine facilitait l'agrégation de Tau en neutralisant les charges positives présentes sur les acides aminés (Goedert et al 1996, Perez et al 1996).

En 1998, Friedhoff et ses collègues redémontrèrent qu'en absence de polyanions l'agrégation était très lente. Par contre l'ajout de polyanions, tel que l'héparine, l'ARN ou le polyglutamate, entraînait une accélération de l'agrégation. Les filaments observés par microscopie électronique étaient torsadés avec une largeur entre 10 et 20 nm et une périodicité d'environ 80 nm, indépendamment du polyanion utilisé (Friedhoff et al 1998b).

A ce jour, nous ne savons toujours pas si un polyanion provoque un effet similaire *in vivo* et, si c'est le cas, quelle est sa nature ? Est-ce que les ARN non codant ou les micro-ARN peuvent jouer un rôle dans cette agrégation ?

4.4.3 L'agrégation à différentes températures

L'étude de l'effet de la température sur l'agrégation de Tau, et spécifiquement du fragment K19, a été menée en 2008 par Jeganathan et coll. (Jeganathan et al 2008). L'agrégation des fragments K19 et K18 a été mesurée après trois jours d'incubation à des températures variant entre 25 et 80°C. Le niveau d'agrégation augmente graduellement entre 25 et 50°C, puis diminue rapidement à partir de 60°C, comme en témoigne la mesure de l'intensité de fluorescence du ThS (Figure 24).

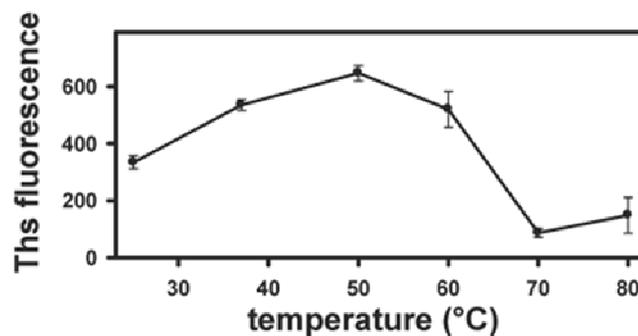


Figure 24 : L'agrégation du fragment K19 en fonction de la température (d'après Jeganathan et al 2008).

Ainsi, l'agrégation de Tau montre deux phases en fonction de la hausse de température. Augmenter la température provoque une rupture des interactions faibles, comme les liaisons hydrogènes, qui stabilisent la protéine. Mais ceci est compensé par des interactions en surface, tel que les interactions hydrophobiques, et par la formation de ponts salins (Elcock 1998) ce qui pourrait être le cas à 50°C. D'autre part, la baisse de l'agrégation au-dessus de 50°C peut être expliquée par la prévention des liaisons hydrogènes du squelette de la protéine Tau ou les interactions entre Tau et héparine, probablement dues à l'énergie cinétique produite par la forte température. En comparaison, l'agrégation de la α -synucléine augmente avec la température, probablement en raison de la formation d'un intermédiaire partiellement replié, plus enclin à l'agrégation que la forme native (Uversky et al 2001).

In vivo, un autre exemple existe où des températures élevées peuvent favoriser l'agrégation des protéines. Des études réalisées sur la Fièvre méditerranéenne familiale (FMF) ont en effet montré la présence de dépôts amyloïdes rénaux. La FMF est considérée comme le prototype des maladies «auto-inflammatoires». Le nom de «auto-inflammatoire» a été créé pour caractériser un groupe de pathologies liées à un déficit de l'immunité innée par analogie aux maladies auto-immunes liées à un déficit de l'immunité acquise (McDermott 1999). Il s'agit d'une maladie génétique autosomique récessive répandue dans certaines populations, particulièrement chez les Arméniens, les Turcs, les arabes et les juifs d'Afrique du Nord.

La fièvre s'élève brutalement à 39-40°C, dure environ 48-72 heures et s'accompagne de douleurs abdominales et thoraciques. Sa survenue plus fréquente dans certaines ethnies pourrait être sous l'influence conjointe de facteurs environnementaux et génétiques en recherche d'identification, tout comme certaines tauopathies. Les accès répétés d'inflammation peuvent conduire à une synthèse excessive de SAA (protéine Sérum Amyloïde A) par le foie, entraînant une élévation des taux sériques et une formation d'agrégats dans les tissus, principalement les reins, sous forme de dépôts amyloïdes (Shohat et al 1999).

4.4.4 L'effet du pH sur l'agrégation de la protéine Tau *in vitro*

Les études réalisées *in vitro* par Jeganathan et collaborateurs sur l'importance du pH ont montré une agrégation faible à pH <5; modérée entre pH 6 et 7 et élevée entre un pH de 8-10, du fragment K19. L'importante agrégation à pH 8-10 peut être expliquée par une diminution de la charge nette de Tau (Figure 25), facilitant ainsi la neutralisation des autres charges positives par l'héparine. Par exemple, la lysine (pKa 10.53) est toujours partiellement chargée à pH 10, mais perd la charge à un pH plus élevé. De plus, les résidus lysine présents au niveau des domaines de liaison aux microtubules R2 et R3 sont connus pour interagir avec l'héparine ainsi que les microtubules (Mukrasch et al 2005, Sibille et al 2006). A pH <4 ou > 11, la protonation ou la déprotonation des acides aminés

chargés aboutirait à l'impossibilité de former des ponts salins. Les faibles valeurs de pH affecteraient les sites chargés de l'héparine l'empêchant ainsi de se lier à Tau.

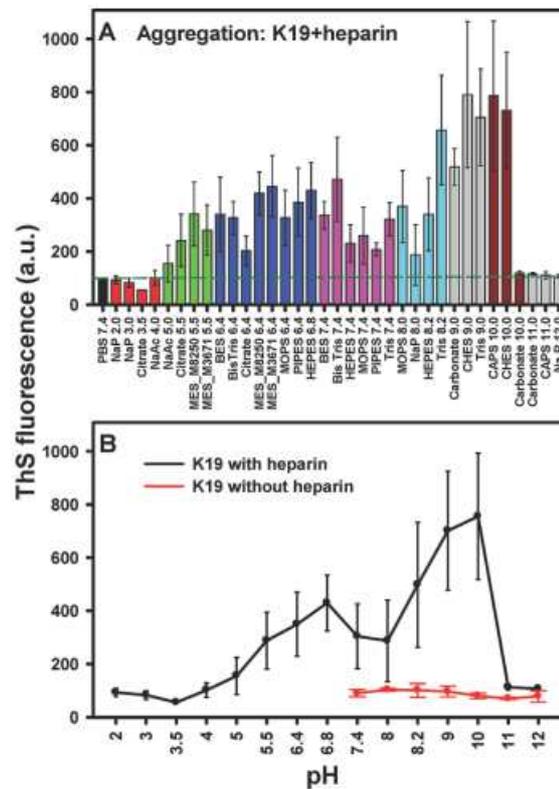


Figure 25 : L'agrégation du fragment K19 en fonction du pH (d'après Jeganathan et al 2008).

L'altération de la voie de dégradation lysosomale dans le cerveau de patients atteints de la MA a été beaucoup décrite (Butler & Bahr 2006, Sweeney et al 2005). Les vésicules lysosomales incorporent par endocytose les protéines à dégrader. Ces vésicules ont un pH acide favorable à une bonne activité des enzymes, les cathepsines (cystine protéinase : cathepsines B, C, H, L, S, aspartate protéinases : cathepsines D et E ; sérine protéinase : cathepsine G). Il existe des preuves montrant que la cathepsine B est associée à des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires dans le cerveau de patients atteints de la MA (Ii et al 1993). La protéine Tau peut être dégradée par les protéases lysosomales telles que la cathepsine D *in vitro* et dans le cytosol (Kenessey et al 1997) ; (Bednarski & Lynch 1996), et l'inhibition des lysosomes peut augmenter le niveau de Tau intracellulaire (Bendiske & Bahr 2003).

Certaines études ont également soulevé l'hypothèse d'un effet facilitateur de la troncation de la protéine Tau sur ses capacités d'agrégation. En effet, des fragments générés par la troncation de Tau et contenant les domaines de liaison aux microtubules seraient davantage enclins à s'agréger (von Bergen et al 2000) (Abraha et al 2000), de par la présence de motifs présentant une structure en feuillets β (von Bergen et al 2000). Plusieurs types de troncations, induites par l'action de protéases telles que les caspases ou la calpaïne, ont été mis en évidence dans les tissus cérébraux des patients atteints de MA (Gamblin et al 2003, Rissman et al 2004) ou dans des études expérimentales utilisant des cultures primaires de neurones hippocampiques murins (Park & Ferreira 2005). De plus, Wang et coll. ont rapporté que des fragments de Tau appelés F2 (S258-V363) et F3 (S258-I360), générés sous l'action de la protéase lysosomiale cathepsin L, pouvaient s'agréger de manière spontanée et induire la nucléation de protéines Tau entières, *in vitro*, induisant par là même une toxicité cellulaire (Wang et al 2007b). Ceci signifierait que le pH acide au sein des vésicules lysosomiales n'est probablement pas un facteur d'agrégation, mais il peut mener vers la coupure de fragments, qui eux, provoqueraient l'agrégation.

En résumé, l'agrégation *in vitro* de la protéine Tau, en présence des 3 et/ou 4 domaines de liaison aux microtubules, s'avère plus efficace et plus rapide dans un milieu réducteur à pH neutre ou légèrement basique, en présence d'un polyanion (Héparine), et à 37°C (Bhattacharya et al 2001) ; (Barghorn & Mandelkow 2002).

5. Modèles animaux de la maladie d'Alzheimer

Les maladies neurodégénératives (MND) constituent un groupe de pathologies progressives liées à un dysfonctionnement métabolique au sein du tissu nerveux, conduisant à la mort des neurones et à la destruction du système nerveux. Afin de mieux comprendre ces maladies neurodégénératives et devant l'incapacité à travailler directement sur le cerveau de patients malades, les scientifiques ont créé de nombreux modèles cellulaires et *in vivo* allant de *C.elegans* (Kraemer et al 2003) aux modèles murins, en passant par *D.melanogaster* (Wittmann et al 2001). Cependant, une grande partie des recherches sont réalisées sur des modèles cellulaires qui permettent de travailler à des cinétiques intéressantes et/ou sur des modèles murins, qui constituent des modèles physiologiques pertinents pour l'étude des maladies neurodégénératives, tel que les Tauopathies. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux modèles transgéniques de souris créés pour l'étude de l'agrégation des protéines Tau au sein des tauopathies.

5.1 Les modèles DFTP-17 en présence de la mutation P301L

Les premières souris transgéniques surexprimant la protéine Tau humaine ont été développées en 1995 (Gotz et al 1995), bien avant la découverte de mutations pathogéniques de Tau (Poorkaj et al ; 1998). Nous nous focaliserons cependant sur les modèles murins présentant la mutation P301L retrouvée dans les DFTP-17. Ces modèles reproduisent certains aspects de la MA, comme la localisation somatodendritique de Tau hyperphosphorylée qui constitue l'étape précédant la formation des DNF.

Avec l'identification en 1998 (Hutton et al 1998), de la mutation P301L dans l'exon 10 de Tau, plusieurs équipes de chercheurs ont développées des souris transgéniques présentant cette mutation. Le premier modèle murin, surexprimant la protéine Tau humaine portant la mutation P301L, est publié par Lewis et collaborateurs en 2000 (Lewis et al 2000). Cette lignée de souris transgénique, appelé JNPL3, exprime l'isoforme (2-3-10+) de Tau. Le niveau

d'expression du transgène est équivalent à celui de la Tau murine endogène. Ces souris présentent des DNF dans différentes zones du cerveau et des pré-DNF dans l'hippocampe et les ganglions basaux, cette formation apparaissant plus tôt chez les souris homozygotes (4,5mois) que chez les hétérozygotes (6,5mois). Dix mois après la naissance, environ 90 % des souris ont développé des troubles moteurs et comportementales. Au niveau neuropathologique, une prolifération des cellules gliales apparaît au niveau de la moelle épinière et 48 % des neurones moteurs dégénèrent. De plus, de nombreux filaments neurofibrillaires de Tau sont détectés, par immunohistochimie, dans les différentes régions du cerveau des souris JNPL3. Ces observations ont été confirmées par des techniques d'imprégnation argentique (Gallyas, Bielchowski) et des marqueurs spécifiques comme le rouge congo ou la Thioflavine S, indiquant que ces agrégats se présentent sous la forme de feuilletts β -plissés. L'étude de ces filaments neurofibrillaires dévoile une hyperphosphorylation de Tau sur différents sites de phosphorylation présents dans la MA, une phosphorylation anormale à l'épitope Thr-231 reconnu par l'anticorps TG-3 et des changements de conformation spécifiques aux protéines Tau pathologiques (épitopes MC-1 et Alz50). De plus, dans ce modèle, les protéines Tau P301L présentent une insolubilité mise en évidence par un fractionnement biochimique utilisant un agent de solubilité appelé sarkosyl. Enfin, l'analyse microscopique des agrégats de Tau révèle la présence de nombreux filaments de structures similaires aux filaments observés dans la pathologie humaine (Figure 26).

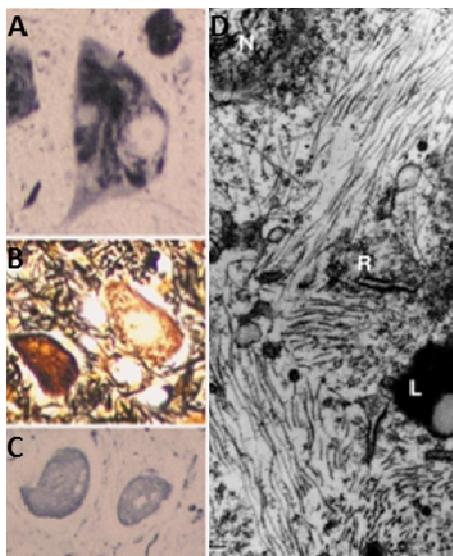


Figure 26 : Caractérisation des filaments fibrillaires dans les souris JNPL3 mutées P301L. Par Coloration par imprégnation argentique Gallyas (A), Bielchowski (B) et Bodian (C). Par microscopie électronique (D). (D'après Hutton et al 1998).

Dans une seconde lignée (pR5), la mutation P301L est exprimée sur l'isoforme la plus longue de Tau (2+3+10+). Le transgène est fortement exprimé dans les neurones corticaux et hippocampiques (Götz et al 2000). Cette expression est accompagnée d'une hyperphosphorylation de Tau P301L au niveau des épitopes AT100, AT8, AT180 et TG3. L'étude montre également une translocation de Tau hyperphosphorylée du corps axonal vers le somatodendritique ainsi qu'une astrocytose et d'une apoptose neuronale. La microscopie électronique montre une formation de filaments droits ou tortueux, de 15 nm d'épaisseur (Figure 27).

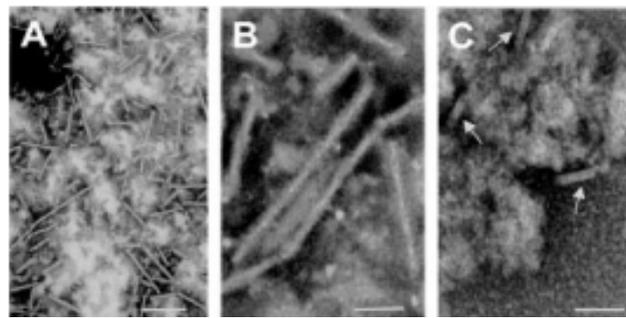


Figure 27 : Caractérisation par microscopie électronique des fibres présentes dans le cerveau de patients atteints de la MA possèdent une épaisseur ~20 nm (A et B) et ceux de souris pR5 possèdent une épaisseur ~15 nm (C). Bar d'échelle 400 nm. (D'après Götz et al 2000).

Ces deux modèles de souris transgéniques des DFTP-17 présentent donc des neurones en DNF caractéristiques des Tauopathies. Il est important de noter que les différences de phénotype observées entre ces deux lignées sont sans doute dues aux isoformes de Tau utilisées et aux promoteurs différents. Toutefois, ces modèles montrent que le simple fait de surexprimer des protéines Tau mutantes chez la souris est suffisant pour entraîner l'agrégation des protéines Tau et la dégénérescence neuronale. De plus, il est important de noter que les protéines Tau agrégées sont hyperphosphorylées (AT100, AT8, AT180 et TG3) et que certaines kinases semblent être impliquées dans cette augmentation de la phosphorylation.

Oddo et collaborateurs en 2003 ont développé un autre modèle de souris transgénique combinant trois mutations : la mutation APP (souris 3xTg-AD), la mutation PS1 (M146V) et la mutation Tau (P301L). Ces souris vont permettre d'étudier la relation entre A β et Tau car elles développent des plaques et des DNF mais surtout elles miment le développement de la pathologie de la MA (Oddo et al 2003). Ces souris présentent un déficit de transmission synaptique avant l'apparition de dépôt extracellulaire A β et la formation de filaments mais en présence de dépôt intracellulaire A β . L'injection d'anticorps anti-A β à ces souris réduit non seulement les plaques extra-cellulaires, mais aussi les dépôts intracellulaires d'A β et surtout la pathologie de Tau (Oddo et al 2004).

SantaCruz et collaborateurs (Santacruz et al 2005) ont créé des souris transgéniques exprimant un variant de Tau humain porteur de la mutation P301L susceptible d'être réprimé. Ces souris développent des DNF, une perte neuronale et des troubles du comportement ainsi que de la mémoire spatiale. Après inhibition de l'expression transgénique de Tau, les souris récupèrent leurs capacités mnésiques, le nombre de neurones se stabilise mais les DNF continuent de s'accumuler.

En 2008, l'équipe de Fred Van Leuven a également essayé de comprendre le lien entre la pathologie Tau et l'amyloïdogénèse en utilisant des modèles murins bigéniques pour la protéine Tau portant la mutation P301L. En effet, les premières études sur souris transgéniques (Hutton et al 1998 ; Götz et al 2000) montraient que le simple fait de surexprimer la protéine Tau mutante (P301L par exemple) entraînait une DNF et l'agrégation de Tau anormalement phosphorylées.

Dans les études qui ont suivi, les stratégies consistaient à observer si la présence de plaques amyloïdes ou un changement dans le métabolisme de l'APP pouvaient potentialiser le phénomène agrégatif de Tau et la DNF. Des travaux récents (Terwel et al 2008) ont comparé deux modèles de souris bigéniques: les mutants APP-V717I \times Tau-P301L combinant les pathologies amyloïde et Tau et les mutants GSK-3 β \times Tau-P301L ne présentant que la pathologie Tau. Des

similarités ont pu être observées entre ces deux lignées par rapport à la lignée parentale Tau P301L :

- l'aggravation de la tauopathie ; avec une forte présence d'enchevêtrements neurofibrillaires au niveau de l'hippocampe et du cortex.
- une survie prolongée corrélée à une tauopathie moindre au niveau du tronc cérébral.
- le développement de troubles cognitifs et comportementaux sévères chez les jeunes adultes avant le début des dépôts amyloïdes ou de tauopathie.
- la présence de phosphoépitopes pathologique de la protéine Tau, incluant le motif caractéristique pS396/pS404 de la GSK3 β .

Les résultats obtenus indiqueraient donc que les peptides A β déclencheraient la tauopathie à travers l'augmentation de l'activité de la kinase GSK3.

Pour résumer ce chapitre, nous avons vu qu'une grande diversité de systèmes murins sont utilisées pour l'étude de la MA. Il n'existe pas de modèle absolu, chacun d'entre eux présentant des avantages et des inconvénients. Les modèles animaux reflètent plus fidèlement l'ensemble des facteurs entrant en jeu ; on peut néanmoins rappeler que la pathologie Tau est recréée chez ces modèles (communément murins) sous sa forme sporadique. En effet, ces deux formes ne possèdent pas les mêmes caractéristiques histopathologiques chez les patients atteints de MA.

Les modèles animaux apparaissent donc comme une étape transitoire qui doit permettre la compréhension des mécanismes pathologiques et la recherche de molécules pharmaceutiques capables de retarder ou d'annihiler ces mécanismes pathologiques, avant de passer aux essais cliniques.

Enfin, un dernier point à soulever est qu'il faut observer une grande prudence quant à l'extrapolation de résultats d'un système à un autre.

6. Infection de type prion

L'implication de Tau extracellulaire dans la neurotoxicité est un concept nouveau mais très important dans les tauopathies et spécifiquement pour la maladie d'Alzheimer. Dans cette maladie, la tauopathie débute dans les neurones du cortex temporo-médian comprenant l'hippocampe, puis s'étend de proche en proche à l'ensemble du cortex cérébral selon un schéma spatiotemporel stéréotypé en parallèle avec le déclin cognitif des sujets affectés (Braak & Braak 1991) (Figure 28).

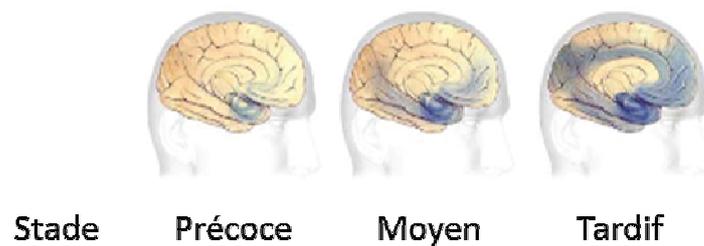


Figure 28 : Modèle de propagation des agrégats de Tau dans le cerveau au cours de la maladie d'Alzheimer.

La présence d'un modèle infectieux au sein de la maladie d'Alzheimer est soutenue par de nouvelles études sur la propagation de la protéine Tau de cellules en cellules (Clavaguera et al 2009, Frost et al 2009). En effet, dans des souris transgéniques exprimant la protéine Tau humaine non mutée, l'injection d'agrégats de Tau provenant d'extraits de cerveaux de souris transgéniques exprimant la protéine Tau mutée P301S, induit l'agrégation de la Tau humaine non mutée en filaments et leur propagation du site d'injection aux régions voisines (Clavaguera et al 2009). Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas encore bien compris, l'hypothèse d'une propagation de type prion a été évoquée, où la protéine Tau pathologique adopterait une conformation tridimensionnelle anormale capable d'induire un changement de conformation de la protéine Tau normale (Frost et al 2009). À terme, les agrégats Tau entraînent la mort lente du neurone. Ces derniers formeraient des « reliquats » ou vestiges des agrégats (Augustinack et al 2002). Ces dépôts devenus extracellulaires pourraient être internalisés afin d'induire de nouvelles inclusions Tau intracellulaires (Frost et al 2009).

7. Les traitements dirigés contre l'agrégation de Tau

Depuis plusieurs années, les scientifiques à travers le monde essaient de s'attaquer à ces problèmes en cherchant les moyens de modifier la progression de la MA. Les 10 dernières années ont permis la mise au point de médicaments qui soulagent les symptômes de la MA, mais les médecins espèrent encore une molécule qui modifiera le cours de la maladie en s'y attaquant à un stade plus précoce.

Les connaissances acquises par l'étude des mutations qui provoquent les DFTP-17 et des modifications post-traductionnels de Tau ont entraîné un intérêt croissant dans le développement de thérapie dirigée contre les tauopathies. La plupart des programmes de découverte de médicaments dirigés contre Tau sont à un stade précoce et très peu avancés par rapport à A β . Cependant, l'échec récent des essais cliniques thérapeutiques tel que Tramiprosate (Gauthier et al 2009) et Flurbiprofen (Green et al 2009) dirigés contre les agrégats A β , souligne la nécessité de poursuivre d'autres approches thérapeutiques, y compris celles qui réduisent la quantité de Tau pathologique.

7.1 Inhibition de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine Tau est phosphorylée sur plusieurs sites et une augmentation importante de la phosphorylation est retrouvée dans le cerveau de patients atteints de la MA (Hasegawa et al 1992, Matsuo et al 1994). La plupart des sites hyperphosphorylés se situent autour du MTBR sauf pour la Ser262 et Ser356 qui se trouvent respectivement dans le domaine R1 et R4. L'identification d'inhibiteurs dirigés contre les kinases pourrait avoir un grand intérêt thérapeutique. Les inhibiteurs de kinases sont activement recherchés dans l'industrie pharmaceutique, essentiellement pour le traitement du cancer. Néanmoins, il existe des défis importants pour développer des inhibiteurs spécifiques des kinases de Tau, car les inhibiteurs actuels sont généralement dirigés contre les sites de fixation de l'ATP partagés par toutes les kinases (Ghoreschi et al 2009).

De nombreux groupes de recherches ont mis au point des inhibiteurs des principales kinases impliqués dans la phosphorylation de Tau (Mazanetz & Fischer 2007) ; (Churcher 2006), mais les inhibiteurs de GSK ont reçu le plus d'attention. Un petit nombre d'inhibiteurs de kinases ont évolué efficacement dans les tests réalisés sur les modèles murins (Figure 29).

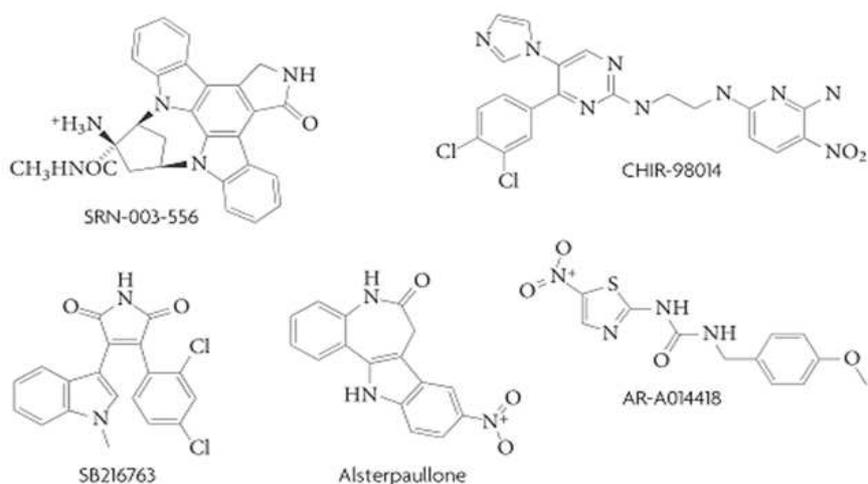


Figure 29 : Molécules inhibitrices de kinases.

7.2 Inhibition de l'agrégation de la protéine Tau

Inhiber la formation de structures oligomériques de Tau pourrait donc empêcher la formation de structures toxiques et favoriser celle de Tau monomériques, contribuant ainsi à la stabilisation des microtubules. Même si le blocage d'interaction protéine-protéine avec de petites molécules est généralement considéré comme difficile en raison de grandes surfaces impliquées dans cette interaction, il existe de plus en plus de preuves que l'oligomérisation de Tau peut être perturbée avec une faible concentration d'inhibiteurs (Figure 30). Ces études ont été grandement facilitées en découvrant que Tau pouvait former des enchevêtrements fibrillaires *in vitro* en présence de cofacteurs anioniques, comme de l'héparine ou des lipides chargés négativement (Wilson & Binder 1997) ; (Hasegawa et al 1997). Par ailleurs, la formation de ces fibres peut être suivie avec des molécules fluorescentes (Thioflavine S et T) pouvant

reconnaitre la formation de structure en feuillet β qui est commune à toutes les fibres amyloïdes.

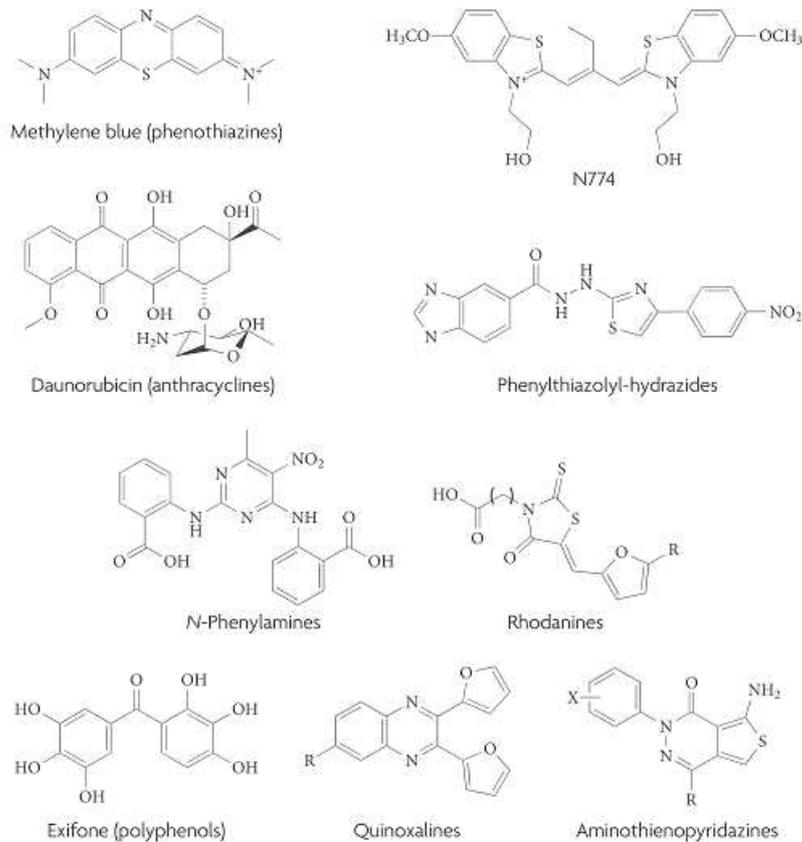


Figure 30 : Inhibiteurs de l'agrégation de la protéine Tau.

Bien que les filaments formés *in vitro* soient similaires au PHFs observés dans les cerveaux de patients atteints de la MA ou d'autres tauopathies, des filaments droits sont retrouvés dans le cerveau de patients atteints de paralysie supranucléaire progressive (Lee et al 2001). Il reste donc à déterminer si les molécules qui bloquent l'oligomérisation de Tau *in vitro* auront une incidence sur tous les types de fibres.

La première molécule ayant pour effet d'inhiber l'interaction Tau-Tau fut le bleu de méthylène (Figure 30), également connu pour son effet sur les PHFs isolés de cerveaux de patients atteints de la MA (Wischik et al 1996). Cette molécule est utilisée dans des essais cliniques sur la MA, les résultats de Phase II présenté à Chicago en 2008 lors de la conférence international sur la MA suggèrent que le bleu de méthylène présente un effet thérapeutique important

(Staff 2008). Un total de 321 patients présentant la maladie d'Alzheimer a été traité avec 30, 60 ou 100mg de bleu de méthylène ou de placebo. Dans cette étude, ce médicament semble ralentir de 81% la progression de la MA sur une année. Selon Wischik et coll., le bleu de méthylène agirait sur l'auto-agrégation de Tau au niveau de la partie du cerveau responsable de la mémoire. Des études de Phase III seront nécessaires pour confirmer l'efficacité de cette molécule.

Une autre molécule, la N744 (Figure 30), a été reconnue comme inhibitrice de la fibrillation de Tau entier, et tout comme le bleu de méthylène, elle pourrait également désagréger les filaments préformés (Chirita et al 2004). Cependant, à une forte concentration cette molécule formerait des agrégats qui accentueraient l'oligomérisation de Tau (Congdon et al 2007).

Un grand nombre de laboratoires ont criblé des banques de molécules dans le but d'identifier des inhibiteurs de la fibrillation de Tau. Par exemple, Mandelkow et coll. ont réalisé un criblage à haut débit d'environ 200 000 molécules sur la fibrillation du fragment Tau 3R suivie grâce à la fluorescence de la Thioflavine S (Pickhardt et al 2005). Cette étude a permis de découvrir des inhibiteurs de la formation de filaments, tels que les anthraquinones, qui peuvent également provoquer la désagrégation des filaments de Tau pré-agrégés, ce qui montre qu'il est possible de découvrir des molécules présentant deux modes d'action différents. De plus, de nombreuses molécules inhibitrices de la famille des N-phénylaminés semblent actives dans les cellules N2a qui surexpriment le fragment de Tau4R (Khlistunova et al 2006). Enfin, des molécules dérivées de la rhodanine peuvent désagréger des filaments préformés et préviennent l'agrégation de Tau dans les cellules N2a (Bulic et al 2007).

D'autres inhibiteurs empêchant la formation de filaments, tels que les phénothiazines, les porphyrines et les polyphénols, ont été identifiés par criblage, fluorescence à la Thioflavine T et microscopie électronique (Taniguchi et al 2005). Un autre criblage d'environ 51 000 molécules sur l'agrégation du fragment Tau4R (Crowe et al 2007) a permis d'identifier plusieurs molécules actives de structures diverses, incluant les anthraquinones, les phénothiazines, les porphyrines et les dérivés sulfonés.

7.3 Le rôle des polyphénols

La famille des polyphénols est un groupe important de petites molécules naturelles composées d'un ou plusieurs cycles aromatiques phénoliques. Leur pouvoir antioxydant aide à lutter contre la formation de radicaux libres dans le corps humain et, ainsi, à ralentir le vieillissement cellulaire.

Les polyphénols sont présents en forte concentration dans le vin, l'huile d'olive, le thé, les noix, les baies, le cacao, et une grande variété de fruits, de légumes et de plantes culinaires (et médicinales). Plus de 8000 composés polyphénoliques ont déjà été identifiés, et leur fonction naturelle est corrélée à la protection des plantes contre les maladies et les rayons ultraviolets et la protection des semences jusqu'à ce qu'ils germent.

L'effet bénéfique sur la santé des polyphénols attirent, depuis une dizaine d'années, un intérêt croissant de la part des chercheurs, des nutritionnistes, des industriels de l'agroalimentaire et des consommateurs. La découverte de polyphénols bioactifs dans le domaine de la neurodégénérescence à un double intérêt :

- au travers de campagnes de sensibilisation sur les bonnes pratiques nutritionnelles on peut espérer un effet préventif ou tout au moins fortement limitant de la progression des tauopathies.
- sous la forme d'extraits de plantes ou de composés purs on peut espérer limiter ou stopper la progression des tauopathies (un effet curatif sous entendrait des molécules capables de faire régresser les agrégats neurofibrillaires).

Au cours de ces dernières années de nombreux articles ont été consacré aux activités inhibitrices de polyphénols naturels sur la formation d'agrégats fibrillaires surtout à partir de peptides β -amyloïdes et, dans certains cas, à partir de protéine Tau et d' α -synucléine (Masuda et al 2006). Ces travaux font suite à des constats épidémiologiques ou s'inspirent d'utilisations de plantes en médecine

traditionnelle. Nous nous limiterons ici aux résultats portant sur les grandes classes de polyphénols naturels (stilbénoides, flavonoïdes, curcuminoïdes, ou catechols). De nombreuses revues sont consacrées aux propriétés des polyphénols naturels dans la prévention de la MA. On peut citer notamment des revues sur le resvératrol (Richard et al 2011), le curcumin et l'epigallocatechine gallate (Kim et al 2010) ou encore les nutriments en général (Ramesh et al 2010).

7.3.1 Resvératrol et stilbénoides

Bien qu'il existe de nombreux stilbénoides, la majorité des études portant sur les propriétés neuroprotectrices sont consacrées au resvératrol. On le retrouve dans le raisin, la mûre, la cacahuète mais c'est surtout sa présence dans le vin (rouge principalement) qui explique l'intérêt qui lui est porté. Le resvératrol inhibe l'agrégation de A β avec une IC₅₀ de 6 μ M alors que le dimère glucosylé ϵ -viniferin glucoside a une IC₅₀ de 0,2 μ M (Riviere et al 2010). De plus, l' ϵ -viniferin glucoside protège les cellules PC-12 des effets cytotoxiques des A β (Richard et al 2011). Tagliazucchi et coll. (Conte et al 2003a, Conte et al 2003b) ont montré que le resvératrol et la catéchine avaient des effets synergiques de protection contre la cytotoxicité de β -amyloïde 1-41. D'autre part, tout en utilisant le stress oxydatif induit par le peroxyde seul, aucun effet de synergie n'a été obtenu. Les auteurs suggèrent que ces polyphénols agissent non seulement par leur activité anti-oxydante, mais aussi que les différences structurales semblent être utile lorsque la toxicité cellulaire est due au peroxyde d'hydrogène (Figure 31).

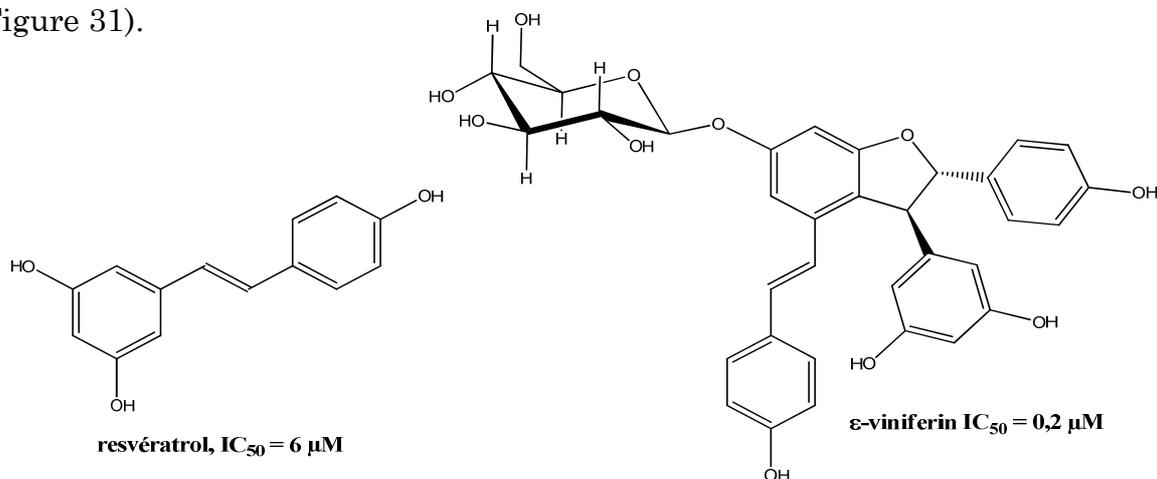


Figure 31 : Structure du resvératrol et de ϵ -viniferin.

7.3.2 Epigallocatechine-3-gallate (EGCG) et Flavonoïdes

L'épigallocatechine gallate (EGCG) est la principale catéchine que l'on trouve dans le thé vert (Figure 32). La consommation de thé vert (et par voie de conséquence d'EGCG) a été associée à une grande variété de propriétés biologiques (anti-VIH, anticancer). L'effet anti-amyloïdogénique des polyphénols a été notamment décrit par Ono et coll. (Ono et al 2003). Ce groupe a utilisé la thioflavine T pour suivre l'agrégation et la microscopie électronique pour examiner l'effet de flavonoïdes liés à la formation, l'élongation, et la déstabilisation des peptides β -amyloïde 40 et β -amyloïde 42. Les flavonoïdes examinés inhibent de manière dose-dépendante la formation de fibrilles, avec une activité dans l'ordre suivant: myricétine = morine = quercétine > kaempférol > catéchine = épicatechine, et des valeurs IC_{50} qui sont compris entre 0,1 et 1 μ M.

Les auteurs ont conclu que ces flavonoïdes pourraient empêcher le développement de la maladie d'Alzheimer, non seulement en piégeant les radicaux libres, mais aussi en inhibant directement le dépôt de fibrilles β -amyloïdes dans le cerveau.

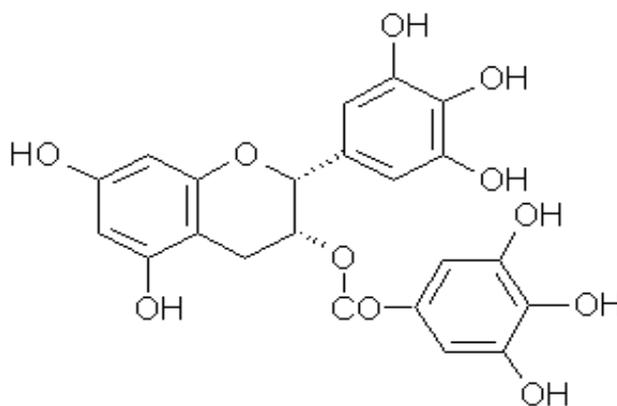


Figure 32 : Structure de l'épigallocatechine gallate.

7.3.3 Curcumin

Le curcumin est le pigment principal du curcuma (*Curcuma longa*), aussi appelé safran des Indes. C'est un pigment polyphénolique qui donne une couleur jaune (colorant alimentaire E100). Le curcumin est un puissant antioxydant (plus actif que la vitamine E) présentant de nombreuses propriétés biologiques (antibactérien, antiinflammatoire). Ono et coll. ont étudiés l'action du curcumin sur l'agrégation *in vitro* des peptides amyloïdes, (Ono et al 2004). Dans cet article, les auteurs ont étudié l'inhibition de la formation, l'extension et la déstabilisation de fibrilles formés à partir d'A β 40 et A β 42 par le curcumin, l'acide rosmarinique et l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) (Figure 33). Les IC₅₀ de ces trois molécules sont dans la gamme 0,1-1 μ M pour les trois activités testées.

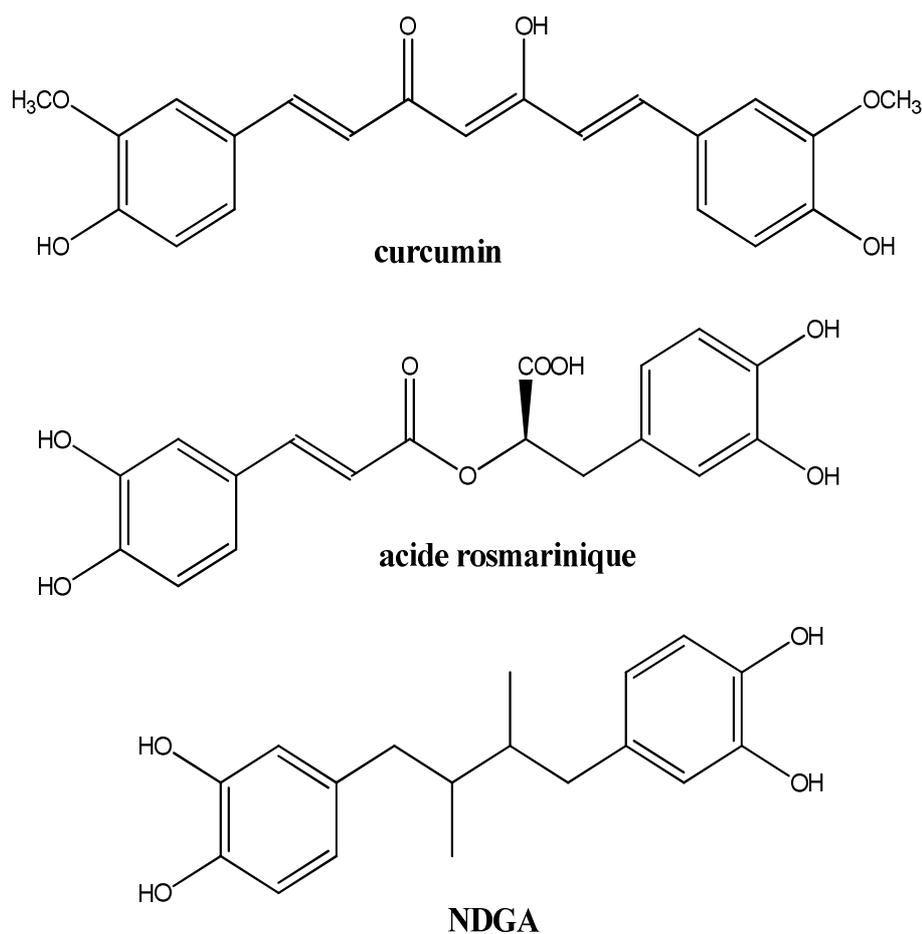


Figure 33 : Représentation du curcumin, de l'acide rosmarinique et de l'acide nordihydroguaiarétique.

7.3.4 Acide rosmarinique

L'acide rosmarinique est un ester de l'acide cafféique et de l'acide 3,4-dihydroxyphényllactique présent dans de nombreuses plantes culinaires et médicinales (romarin, mélisse (citronelle), sauge, basilic, lavande, brunelle, sariette, menthe) (Figure 33). *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* et *Melissa officinalis* ont été utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de démence modérée. En plus de son action sur A β 40 et A β 42 reportée par Ono et coll. (Ono et al 2004), l'acide rosmarinique s'est révélé efficace contre le défaut de mémorisation sur un modèle murin (induit par injection de A β 25-35) (Alkam et al 2007). Enfin, l'effet cytoprotecteur de l'acide rosmarinique a été démontré sur la cytotoxicité de A β 42 sur cellules neuronales PC12 (Iuvone et al 2006). Le choix de l'acide rosmarinique est par ailleurs souvent basé sur ses capacités de capteur de peroxy-nitrite (Choi et al 2002). Cette espèce hautement réactive est connue pour être responsable de graves dommages dans le cerveau de patients atteints de MA (Castegna et al 2003, Smith et al 1997).

7.4 L'effet des polyphénols sur l'agrégation de Tau

Taniguchi et ses collègues (Taniguchi et al 2005) ont étudié l'effet inhibiteur de plusieurs petites molécules, dont une douzaine de composés polyphénoliques, pour leur capacité à inhiber l'agrégation de Tau et β -amyloïde 1-40 en filaments. Une bonne corrélation a été observée entre le rapport puissances de polyphénols dans l'inhibition de l'assemblage des protéines Tau et β -amyloïde 1-40. Les polyphénols suivants, purpurogalline, exifon, l'hypéricine, myricétine, gossypétin, gallate d'épicatéchine pentahydroxybenzophenone, et THBP, ont tous un effet inhibiteur sur les protéines Tau et A β 40, avec une faible IC₅₀ autour du micromolaire, et une IC₅₀ plus petite pour l'inhibition de A β 40.

Par la séparation des protéines monomériques et filamenteuses par ultracentrifugation et électrophorèse sur gel SDS, les auteurs ont démontré que la myricétine était liée plus fortement aux oligomères, qu'à la forme monomère de Tau. Ils ont également montré que les composés polyphénols inhibiteurs n'influencent pas le bon fonctionnement des protéines Tau à interagir avec les

microtubules. En résumé, ils ont conclu que des mécanismes similaires d'inhibition existent entre A β et Tau, et un composé donné pourrait être efficace contre les deux pathologies (Taniguchi et al 2005). En complément de ce premier article, les mêmes auteurs ont publié, un an plus tard (Masuda et al 2006), un travail portant sur 79 composés dont une quarantaine de polyphénols. Les polyphénols les plus actifs sur l'agrégation de la protéine Tau renferment, pour la plupart, un motif pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzène).

7.4.1 Polyphénols dans l'olive et l'huile d'olive

Des composés phénoliques sont également présents dans l'huile d'olive qui est l'un des ingrédients majeurs du régime alimentaire méditerranéen. Ces composés augmentent la stabilité de l'huile d'olive, lui confère des propriétés antioxydantes et modulent sa saveur (Brenes et al 2000).

Différentes familles de composés phénoliques sont présentes dans les olives et dans les huiles :

- Les dérivés sécoiridoïdes qui sont des composés glycosylés issus du métabolisme secondaire des terpènes (Soler-Rivas et al 2000). Parmi eux, l'oléuropéine (Figure 34A) est le composé majoritaire dans les feuilles d'olivier et dans les olives et c'est le principal responsable de l'amertume des olives (Andrews et al 2003; Shasha & Leibowitz 1961). Cette molécule est présente dans l'huile d'olive et l'huile d'olive extra vierge à une concentration de 2.3-9.0 mg/L et 2.04 ± 0.78 mg/L respectivement. Cependant, lors de la transformation en huile d'olive, elle est hydrolysée en de nombreux dérivés de masses moléculaires très variables, la plus grosse molécule résiduelle étant l'oléuropéine aglycone (18.64 ± 3.36 mg/L) (Coni et al 2000).
- les lignanes telles que le pinorésinol et l'acetoxy-pinorésinol sont également détectées dans les huiles (Yang et al 2007 ; Brenes et al 2000) (Figure 34B).
- des flavonoïdes font également partie des composés majoritaires trouvés dans l'huile, il s'agit de l'apigénine et de la lutéoline (Ocakoglu et al 2009).

- les phénols simples : deux sous-catégories avec les alcools phénoliques et les acides phénoliques. Dans le premier groupe, nous retrouvons l'hydroxytyrosol et le tyrosol (Romero et al 2002) (Figure 34C). Ces deux composés sont directement dérivés de l'hydrolyse de l'oleuropéine et du ligstroside. La concentration de l'hydroxytyrosol dans l'huile d'olive est entre 1.4–5.6 mg/L (Coni et al 2000). Une plus grande concentration (4.42 ± 3.01 mg/kg) est trouvée dans l'huile d'olive extra-vierge (Owen et al 2000). Dans le groupe des acides phénoliques on peut citer l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique ou encore l'acide vanillique qui sont également généralement retrouvés dans les huiles (Yang et al 2007); (Tuck & Hayball 2002).

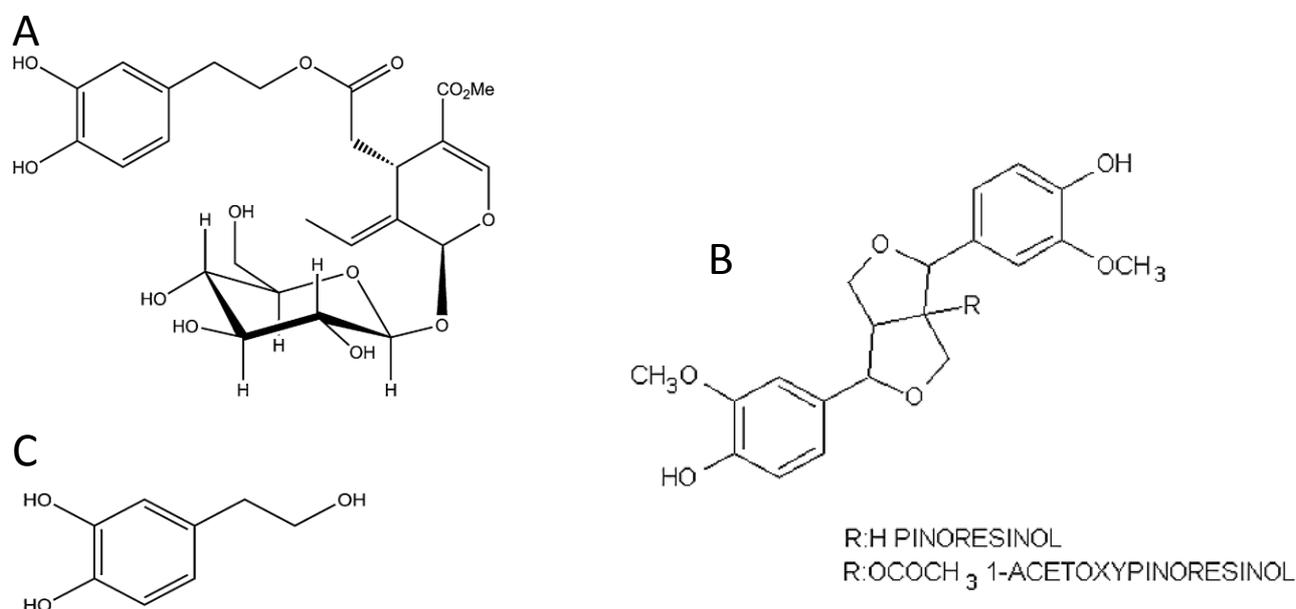


Figure 34 : Représentation de l'oleuropéine (A), de pinorésinol, et de l'acetoxy-pinorésinol (B) et de l'hydroxytyrosol (C).

L'effet bénéfique sur la santé est essentiellement dû aux composés phénoliques présents dans l'huile d'olive. En effet, l'activité antioxydante entraîne : la protection de l'huile de l'oxydation (donc augmentent sa durée de vie) mais ils augmentent également le bagage antioxydant de l'organisme et

prévient, ainsi, le développement de certaines maladies. Des extraits d'huile d'olive ont souvent été utilisés *in vitro* pour tester leur activité vis-à-vis de la prolifération de cellules cancéreuses. C'est notamment le cas sur les lignées SKBR3 et JIMT-1 qui sont des lignées de référence en matière de cancer du sein car elles surexpriment le gène oncogène, HER2 (Garcia-Villalba et al 2010, Menendez et al 2009). Une étude sur le cancer du côlon a également montré que des extraits phénoliques d'huile d'olive semblaient réduire la capacité d'adhésion des cellules cancéreuses, ce qui ralentirait la prolifération du cancer du côlon (Hashim et al 2008).

Individuellement, des composés tels que l'hydroxytyrosol et l'acide vanillique (à moindre échelle le tyrosol) ont démontré de fortes activités antioxydantes (Owen et al 2000). Ils ont aussi été associés à certains effets bénéfiques dans la protection de certaines maladies. Ainsi, l'hydroxytyrosol exerce une action inhibitrice sur les lipooxygénases ce qui va protéger les acides gras de l'oxydation et donc *in vivo* réduire le dépôt des LDL dans les parois artérielles (Visioli & Galli 1998). L'hydroxytyrosol est capable de donner un hydrogène au radical LOO° puis de se stabiliser. En ce qui concerne la prévention des maladies cardio-vasculaires, il est aussi associé à une réduction de l'agrégation plaquettaire tout comme la lutéoline et l'apigénine (Petroni et al 1995). La présence de quelques polyphénols et de l'hydroxytyrosol est également corrélée à une réduction de la formation de molécules pro-inflammatoires comme les thromboxanes et les leucotriènes (Rotondo & de Gaetano 2000).

Deux études ont montré un effet hypocholestérolémique et hypoglycémique de l'oleuropéine et de l'oleuropéine aglycone (Ficarra et al 1991). Ces deux composés et l'hydroxytyrosol sont également impliqués dans la protection de l'organisme contre certains agents pathogènes responsables de maladies intestinales ou du système respiratoire (Bisignano et al 1999).

L'oléuropeine ne pénètre pas les cellules humaines monocouches Caco-2 ou les segments de jejunum et d'iléum de rats, et a donc peu de chance d'atteindre

les cellules neuronales telle quelle. Pour cette raison, l'absorption, la distribution et l'élimination de l'hydroxytyrosol a fait l'objet de nombreuses études (D'Angelo et al 2001, Visioli et al 2003). Ceci d'autant plus que l'hydroxytyrosol est aussi un métabolite de la dopamine. Une concentration basale de 2 ng/g dans le cerveau de rats Sprague-Dawley a été mesurée (Edwards and Rizk 1980). Les zones riches en innervation dopaminergique comme le striatum présente une concentration basale triple (6 ng/g chez le cerveau de rat Wistar) (Thiede & Kehr 1981). Cependant, 20 minutes après injection de 100 mg/kg d'hydroxytyrosol, la concentration de hydroxytyrosol dans le cerveau peut augmenter d'un facteur 1000 pour une valeur de 14 μ M (Wu et al 2009). Ceci démontre sans ambiguïté que l'hydroxytyrosol est capable de passer la barrière hématoencéphalique. Dans une autre étude pharmacocinétique chez le rat, il a été montré que l'hydroxytyrosol injecté par voie intraveineuse (1.5 mg/kg) est rapidement distribué dans tout le corps avec une concentration maximale de 3 μ M dans le cerveau, 5 minutes après l'injection (D'Angelo et al 2001). Bien que la concentration basale de l'hydroxytyrosol dans le cerveau de rat se situe dans une gamme nanomolaire (Xu & Sim 1995), elle peut atteindre une concentration micromolaire par administration exogène.

Pour ce qui est de l'oléuropeine aglycone, aucune donnée n'est disponible concernant sa biodisponibilité, le passage de la barrière hématoencéphalique ou encore le passage de membranes biologiques. Cependant l'oléuropéine aglycone est plus lipophile que l'oléuropéine (Cicerale et al 2009). Durant notre travail, un article reportant l'activité de l'oléuropéine aglycone sur l'agrégation de β -amyloïde 1-42 a été publié (Rigacci et al 2011).

Si toutes ces études ont permis de mettre en évidence certaines actions des composés phénoliques, beaucoup de choses sont encore à découvrir car les effets bénéfiques mis en évidence par des études épidémiologiques ne sont pas pleinement expliqués. Les composés phénoliques peuvent également présenter des effets synergiques entre eux ce qui complique la mise en évidence d'effets spécifiques de chacun d'entre eux. Ce qui semble

acquis c'est qu'une ingestion régulière de composés phénoliques comme ceux présents dans l'huile d'olive est fortement corrélée à une diminution des risques de développement de maladies dégénératives, cardiovasculaires ou de cancers.

En résumé, plusieurs classes de petites molécules inhibitrices de l'agrégation ont été identifiées et certaines d'entre elles peuvent également provoquer la désagrégation de filaments pré-agrégés. Un grand nombre d'inhibiteurs existants possèdent des propriétés chimiques et/ou biologiques qui peuvent les rendre inutilisables *in vivo*, en produisant des espèces réactives non spécifiques. Par ailleurs, il est possible que certains de ces inhibiteurs forment des structures colloïdales qui provoquent une inhibition non spécifique de la polymérisation amyloïde (Feng et al 2008). Néanmoins, la poursuite des efforts dans ce domaine est susceptible d'engendrer la découverte de composés actifs dans les modèles murins mimant une tauopathie, une étape importante pour déterminer le potentiel thérapeutique d'une molécule inhibitrice de la formation de filaments. Plusieurs des molécules décrites précédemment requièrent une concentration équimolaire avec la protéine Tau pour bloquer l'agrégation *in vitro*, ce qui signifie qu'une forte concentration sera peut être nécessaire pour une bonne efficacité dans le cerveau. Cependant, il a été estimé que plus de 99% des protéines Tau sont fixées aux microtubules (Congdon et al 2008), et que la concentration de Tau libre dans les neurones est inférieure à 20 nM (Drubin et al 1985).

***MATERIELS ET
METHODES***

1. Production de la protéine Tau 441 humaine recombinante

1.1. Production

La région codant pour la protéine Tau entière comportant 441 résidus (non mutée, mutée P301L, et P301L2CS sans Cystéine) a été insérée dans le vecteur pET15b entre les sites de restriction NcoI et XhoI, alors que le fragment Tau F4 est inséré dans un vecteur pET9aM entre les sites de restrictions NdeI et NotI, permettant ainsi leur expression en système hétérologue dans une souche bactérienne fournie par Novagen, *Escherichia coli* BL21(DE3)star, sans Tag Histidine. Afin de réaliser l'acquisition des spectres RMN de la protéine Tau, nécessaire à sa caractérisation, un marquage de la protéine a été réalisée en faisant pousser les cellules dans le milieu minimal modifié M9 supplémenté de 1g/L de chlorure d'ammonium ^{15}N NH_4Cl (pour les spectres 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$) et/ou de 2g/L de glucose ^{13}C (pour les spectres 3D $^1\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$) à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,6. L'expression de Tau a ensuite été induite par l'addition de 0,4 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG).

Le marquage isotopique est nécessaire pour une étude ultérieure en RMN. En effet, la RMN en solution est principalement concernée par les isotopes nucléaires stables ayant un spin $\frac{1}{2}$. Les macromolécules biologiques sont généralement constituées d'atomes d'hydrogène, d'azote, de carbone, d'oxygène, de soufre et de phosphore. Pour les protéines, l'hydrogène et le phosphore sont les seul noyaux de spin $\frac{1}{2}$ dont l'abondance naturelle est proche de 100 %. Le ^{15}N et le ^{13}C ont un spin $\frac{1}{2}$ mais une abondance naturelle de 0.37 % et 1.1 % respectivement, ce qui ne permet pas d'obtenir une sensibilité suffisante pour une étude par RMN.

La protéine utilisée pour étudier l'agrégation *in vitro* par diffusion de la lumière ou fluorescence du ThS n'est pas marquée, elle a été exprimée dans du milieu LB (Luria Broth).

1.2. Purification

La purification de la protéine recombinante inclut une première étape de chauffage de l'extrait protéique pendant 15 minutes à 75°C, suivie d'une chromatographie d'échange cationique (MonoS HR5/5, GE Healthcare) dans un tampon phosphate à pH 7.0.

L'intégrité de la protéine dans les différentes fractions obtenues est vérifiée par gel SDS puis les fractions retenues sont mélangées et échangées contre un tampon de bicarbonate d'ammonium 50 mM par dessalage sur résine G25 (Hiprep 26/10 desalting, GE healthcare) avant d'être lyophilisées. La concentration de la protéine Tau recombinante est déterminée à 280 nm avec un coefficient d'extinction molaire ϵ de 7700 M⁻¹ cm⁻¹. La protéine lyophilisée est directement solubilisée dans le tampon RMN adéquat à l'expérience.

Le propionate de triméthylsilyle (TMSP) est utilisé comme référence interne pour les expériences RMN (0 ppm pour le déplacement chimique 1 H).

2. Caractérisation de l'agrégation par l'outil RMN

2.1. Spectre HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

L'acquisition des spectres RMN a été réalisée à 293 K (20°C) sur un spectromètre Bruker DMX600 doté d'une sonde cryogénique triple résonance. L'attribution des résonances des résidus phosphorylés de Tau a été effectuée grâce aux expériences classiques de triple résonance. L'analyse des spectres a été effectuée en utilisant le programme Bruker TOPSPIN. L'expérience 2D HSQC ¹H-¹⁵N permet de corrélérer chaque azote avec le ou les atomes d'hydrogène qui lui sont liés covalamment. Ce spectre constitue l'empreinte de la protéine d'étude.

Dans une protéine, chaque résidu est caractérisé par les atomes N et H de sa fonction amide, à l'exception des prolines (dont l'azote ne porte aucun hydrogène) et du résidu N-terminal (l'hydrogène de la fonction amine étant labile). Chacune des liaisons amides N–H d'une protéine enrichie en ¹⁵N donne lieu à un pic de corrélation sur le spectre HSQC ¹H-¹⁵N. Un simple coup d'œil au spectre HSQC nous renseigne sur la structuration d'une protéine (Figure 35).

Ainsi des pics (ou taches) de corrélation présentant une large dispersion sont caractéristiques d'une protéine structurée telle que la peptidyl prolyl isomérase PIN1. A l'inverse, des pics de corrélation faiblement dispersés, se superposant parfois et formant un « massif » sont typiques d'une protéine désordonnée comme la protéine Tau.

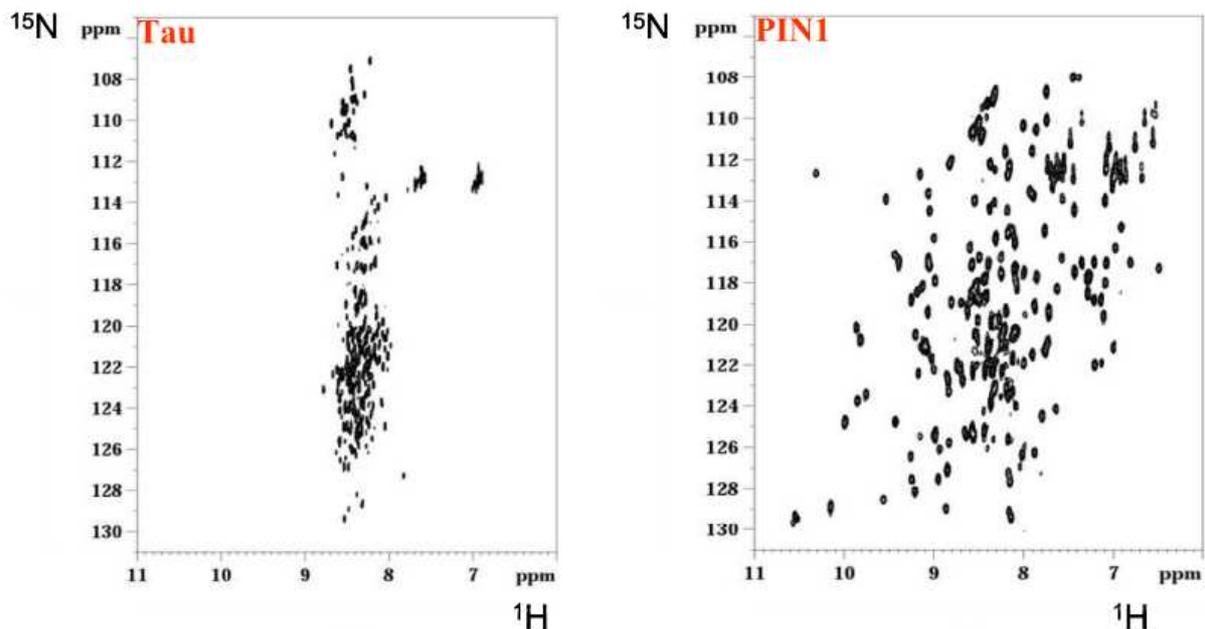


Figure 35 : Spectres HSQC ^1H - ^{15}N de la protéine Tau (à gauche) et de la peptidyl prolyl isomérase PIN1 (à droite). La différence notable dans la dispersion des pics de corrélation est conditionnée par l'état structural de la protéine.

La position de la tache dans le spectre est décrite par les déplacements chimiques du proton et de l'azote. Pratiquement sur un spectre RMN, le déblindage se traduit par une (petite) déviation des signaux (shift en anglais) vers la gauche, tandis qu'un blindage se traduit par une déviation vers la droite. Le déplacement chimique est fortement sensible au type d'atome lié au proton (carbone, oxygène, azote), à son implication dans des liaisons non covalentes comme les liaisons hydrogène.

La RMN est un outil qui a permis à notre équipe de définir le cœur de la fibre impliqué dans le processus d'agrégation (Sillen et al 2005) mais nous a également permis d'attribuer les différents acides aminés du spectre de la protéine Tau.

3. Etude de l'agrégation *in vitro*

3.1 Mesure de l'agrégation par diffusion de la lumière ou Light Scattering

La protéine lyophilisée est dissoute dans un tampon phosphate 25mM, NaCl 25mM à pH 6.8 ou tampon sodium acétate 3mM à pH 4.08. La protéine est ensuite incubée à 37°C en présence ou absence d'héparine (6000 Da, Sigma-Aldrich) et/ou de DTT dans une cuvette quartz 2mm. Puis, l'agrégation est mesurée sur la nuit par Light Scattering dans un spectrofluorimètre PTI (PTI Monmouth Junction), avec une longueur d'onde d'excitation de 600nm et une longueur d'onde d'émission à 610nm. L'avantage de cette méthode est de permettre de suivre l'agrégation sans la nécessité de rajouter un fluorophore tel que la thioflavine. Cela permet donc de cribler un nombre de molécules plus important car il ne peut y avoir de compétition avec le fluorophore. L'inconvénient majeur est lié au seuil de détection de cette méthode qui ne permet d'observer que les fibres dont la taille est supérieure à la longueur d'onde d'excitation de 600nm.

3.2 Mesure de l'agrégation par fluorescence de la Thioflavine S

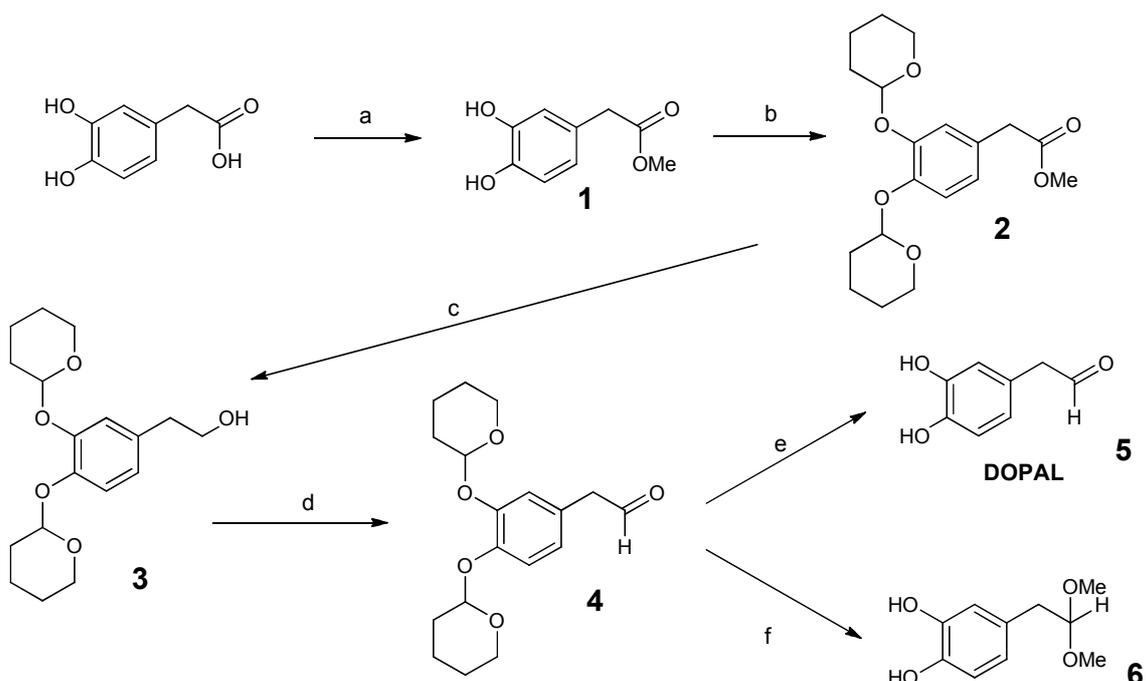
Pour suivre l'agrégation de la protéine Tau, la thioflavine S (5 μ M) (ThS) est ajoutée soit après une nuit d'incubation à 37°C à la solution polymérisée présente dans une plaque 384 (30 μ L) puits, soit au début de la polymérisation dans une plaque 96 puits (100 μ L) (Greiner Bio-one). Les plaques sont ensuite recouvertes d'un film transparent et introduites dans le lecteur de plaques (Infinite M1000, TECAN). Les longueurs d'excitation et d'émission sont de 490nm et 440nm respectivement. Cette technique est plus sensible que le light scattering car la thioflavine se fixe au niveau des feuillettes β formés lors de l'agrégation, elle permet donc un suivi plus précis du processus d'agrégation. En revanche, cette méthode présente un inconvénient important, la possibilité d'une compétition entre la thioflavine et les molécules anti agrégatives, mais ce problème peut être contourné en ajoutant le fluorophore à la fin de la polymérisation.

4. Molécules testées

L'oléuropéine a été fournie par Extrasynthèse, Lyon. L'oléuropéine aglycone a été préparée par clivage enzymatique du glucose de l'oléuropéine par la β -glucosidase d'amande (EC 3.2.1.21; 7.80 U/mg, Sigma) selon le protocole décrit par Limiroli et coll. (1995). La pureté a été vérifiée par LC-MS utilisant une colonne Waters XTerra C₁₈ sur un système HPLC Waters Alliance 2695 (H₂O/MeCN gradient) et une détection simultanée UV 254 nm et spectrométrie de masse ESI⁺ sur un spectromètre micromass ZQ. L'hydroxytyrosol a été préparé par voie chimique par réduction de l'ester éthylique de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (Bianco et al 1988). L'acide rosmarinique (SigmaAldrich) est mono ou dinitré selon le protocole décrit par Dubois et al (Dubois et al 2008).

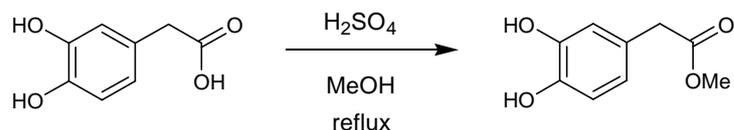
L'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC), la dopamine et l'alcool homovanillique sont fournis par Sigma-Aldrich. La synthèse des époxydibenzocyclooctènes A et B, du tétrahydroxyphénylnaphtalène et des benzofuranes ont été décrites (Maurin et al 2005, (Dupont & Cotelle 2001, Dupont et al 2001a, Dupont et al 2001b). Le 3,4-dihydroxyphényléthanal (DOPAL) et le 2-(3,4-dihydroxyphényl)-1,1-diméthyléthane (DOPAL méthyl acétal) ont été synthétisés par Mlle Hinatée Ploton (étudiante en master 2 de chimie-biologie).

Le 3,4-dihydroxyphényléthanal (DOPAL) et 2-(3,4-dihydroxyphényl)-1,1-diméthyléthane (DOPAL méthyl acétal) ont été synthétisé par Hinatée Ploton (étudiante en master 2 de chimie-biologie) selon les protocoles suivants :



a) H_2SO_4 , MeOH, reflux. b) PPTS, DHP. c) LiAlH_4 . d) Dess-Martin periodinane. e) Amberlite ou APTS. f) MeOH, APTS

Synthèse du 3,4-dihydroxyphénylacétate de méthyle (1):



Mode opératoire :

On dissout 5 g (soient 29,7 mmol) d'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique dans 300 ml de méthanol et 9 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés. On porte à reflux la solution sur une nuit. Le méthanol est ensuite évaporé et le résidu de la solution est repris dans l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, puis avec de l'eau et est ensuite séchée sur sulfate de magnésium. Le solvant est évaporé. On récupère le produit sous la forme d'une huile marron, de masse 3,895 g, soit 21,4 mmol et un rendement de 72 %.

Caractéristiques :

Formule brute : C₉H₁₀O₄

Masse moléculaire : 182 g/mol

Rapport frontal : 0,2 (éluant : EtOAc/cyclohexane 3:7)

Analyse RMN :

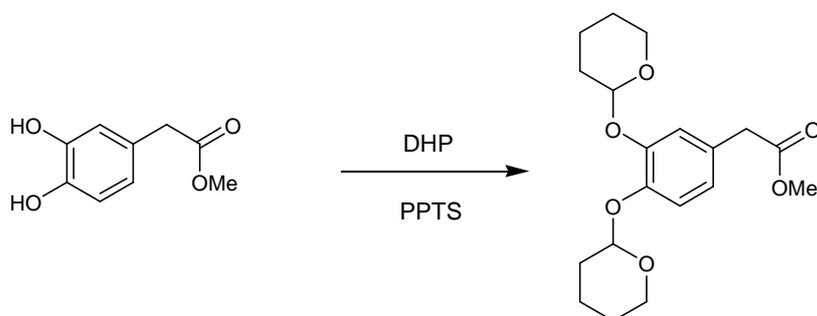
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 6.74 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.14 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.52 (s, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 174.14 (COOMe), 144.15 (C), 143.46 (C), 126.28 (C), 122.00 (CH), 116.61 (CH), 115.75 (CH), 52.76 (CH₃), 40.76 (CH₂).

Analyse infrarouge :

IR (cm⁻¹) : 3369, 1715, 1608, 1521, 1463, 1113, 1013, 964, 797, 720.

Synthèse du 3,4-bis(tétrahydropyran-2-yloxy)phénylacétate de méthyle (2):



Mode opératoire :

On dissout 3,61 g de composé **5** (soient 19,85 mmol) et 181 mg de *p*-tosylate de pyridinium (0.72 mmol) dans 72 ml de dichlorométhane, et on traite cette

solution goutte à goutte avec 9 ml de dihydropyrane présents dans 11 ml de dichlorométhane. Le mélange réactionnel est agité sur la nuit puis est lavé avec de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié sur colonne chromatographique avec silice (éluant : 15% EtOAc/ 0,5% Et₃N/ cyclohexane). On récupère 3,835 g de produit sous la forme d'une huile blanche, soit 10,95 mmol de produit correspondant à 55 % de rendement.

Caractéristiques :

Formule brute : C₁₉H₂₆O₆

Masse moléculaire : 350,2 g/mol

Rapport frontal : 0,27 (éluant : EtOAc/cyclohexane 2:8)

Analyse RMN :

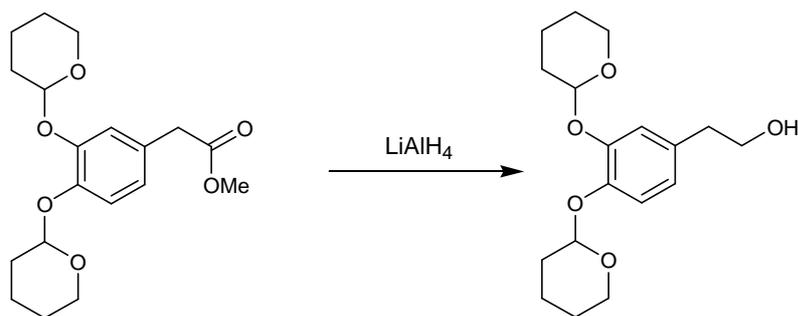
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.48 – 5.37 (m, 2H), 4.09 – 3.92 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.65 – 3.50 (m, 4H), 2.11 – 1.83 (m, *J* = 31.3, 12.4 Hz, 6H), 1.74 – 1.58 (m, 6H).

Le spectre ¹³C présente beaucoup de pics, puisque le composé est présent sous la forme de deux diastéréoisomères, d'où la difficulté à l'interpréter.

Analyse infrarouge :

IR (cm⁻¹): 3063, 1738, 1588, 1508, 1463, 1434, 1388, 1356, 1260, 1202, 1108, 730, 720.

Synthèse du 2-[3,4-bis(tétrahydropyran-2-yloxy)]phényléthanol (3):



Mode opératoire :

On dissout 3,485 g (soient 9,95 mmol) de composé **6** dans 90 ml de tetrahydrofurane anhydre (bien placer le tout sous argon), puis on y ajoute 450mg d'hydrure double de lithium et d'aluminium (11.9 mmol) lentement. L'agitation est laissée sur la nuit (toujours sous argon). Le mélange est ensuite lentement neutralisé avec 1,5 ml d'eau, 1 ml de soude à 15 % puis 3 ml d'eau. On ajoute ensuite une spatule de sulfate de magnésium à la solution pour assécher les sels d'aluminium, puis le mélange est filtré sur celite (rinçage du ballon avec de l'éther de diéthylique). Le solvant est ensuite évaporé et le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle et de l'eau. Les phases sont séparées puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées. Le produit est purifié sur colonne chromatographique avec silice (éluant : EtOAc/cyclohexane 1 :2). On récupère 2,98 g d'alcool protégé sous la forme d'une huile jaune, soient 9,25 mmol correspondant à 93 % de rendement.

Caractéristiques :

Formule brute : $C_{18}H_{26}O_5$

Masse moléculaire : 322 g/mol

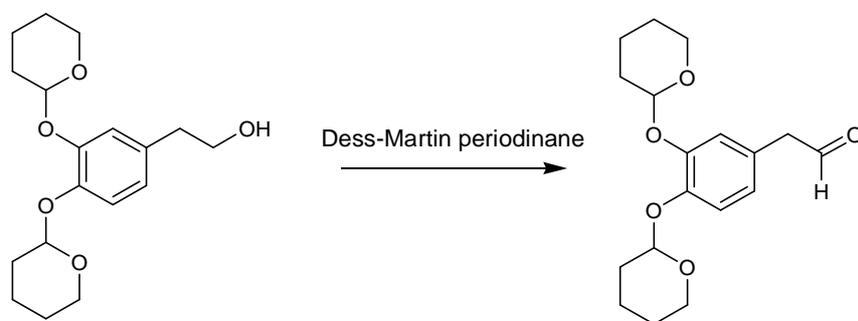
Rapport frontal : 0,148 (éluant : EtOAc/cyclohexane 1 :2)

Analyse RMN :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 7.07 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.47 – 5.37 (m, 2H), 4.04 – 3.94 (m, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.67 – 3.33 (m, 4H), 2.78 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.00 – 1.81 (m, $J = 28.4, 9.3$ Hz, 6H), 1.74 – 1.59 (m, 6H). Le pic du –OH n'est pas observé.

Le spectre ^{13}C présente beaucoup de pics, puisque le composé est présent sous la forme de deux diastéréoisomères, d'où la difficulté à l'interpréter.

Synthèse du [3,4-bis(tétrahydropyran-2-yloxy)]phényléthanal (4):



Mode opératoire :

On dissout 4 g de réactif de Dess-Martin (9.47 mmol) dans 70 ml de dichlorométhane, puis on y ajoute 2,54 g d'alcool protégé (soient 7,89 mmol) préalablement dissout dans 70 ml de dichlorométhane. Après 4 h d'agitation à température ambiante, la solution est diluée avec de l'éther diéthylique et agitée 10 minutes avec 140 ml d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée/thiosulfate de sodium saturée (1:1). Les phases sont séparées, la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique et les fractions organiques combinées sont lavées avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée, de l'eau et de la saumure. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, puis le solvant est évaporé. Le résidu est filtré sur silice (éluant : 20% EtOAc/cyclohexane) pour obtenir 999,2 mg d'une huile jaune (soient 5,54 mmol), ce qui correspond à 68 % de rendement.

Caractéristiques :

Formule brute : C₁₈H₂₄O₅

Masse moléculaire : 320 g/mol

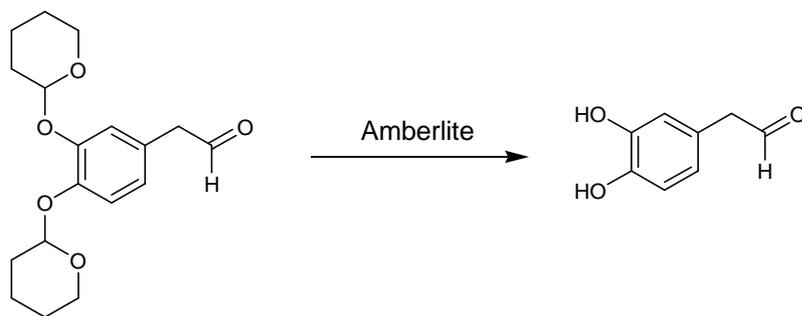
Rapport frontal : 0,195 (éluant : EtOAc/cyclohexane 2:8)

Analyse RMN :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ 9.69 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 6.99 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.78 (dt, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 5.47 – 5.37 (m, 2H), 4.05 – 3.88 (m, 2H), 3.68 – 3.43 (m, *J* = 2.5 Hz, 4H), 2.01 – 1.77 (m, 6H), 1.74 – 1.56 (m, 6H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ 199.97 (CHO), 148 (C), 147 (C), 126.23 (C), 123.91 (CH), 119.98 (CH), 119.12 (CH), 97.90 (CH), 97.49 (CH), 62.14 (CH₂), 61.98 (CH₂), 50.22 (CH₂), 30.57 (CH₂), 30.54 (CH₂), 25.50 (2XCH₂), 18.84 (CH₂), 18.72 (CH₂).

Synthèse du DOPAL (3,4-dihydroxyphényl)éthanal (5):



Mode opératoire :

On dissout 200 mg d'aldéhyde protégé (soient 0,625 mmol) dans 24 ml d'un mélange tétrahydrofurane/eau 9 :1. On y ajoute 500 mg de résine échangeuse

d'ions Amberlite acide fort (IR-120H) préalablement lavée avec de l'acide chlorhydrique 1M, de l'eau (jusqu'à obtention d'un pH neutre du filtrat), et du tetrahydrofurane. La réaction est agitée toute une nuit à température ambiante, est portée à reflux toute une journée et réagitée à température ambiante sur une nuit. L'amberlite est ensuite filtrée et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié sur colonne chromatographie avec silice (éluant : 10 % EtOAc/cyclohexane puis augmentation de la polarité). On récupère 24 mg de DOPAL sous la forme d'une huile marron, soient 0,16 mmol et un rendement de 25 %.

Caractéristiques :

Formule brute : $C_8H_8O_3$

Masse moléculaire : 152 g/mol

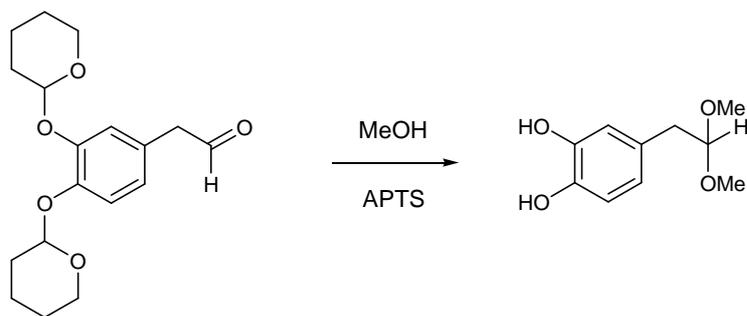
Rapport frontal : 0,051 (éluant CCM : EtOAc/cyclohexane 2:8)

Analyse RMN :

RMN 1H (300 MHz, DMSO) : δ 9.60 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.89 (d, $J = 18.3$ Hz, 2H), 6.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.49 (dd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, 1H), 3.53 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO) : δ 201.68 (CHO), 146.40 (C), 145.33 (C), 123.96 (C), 121.43 (CH), 117.93 (CH), 116.78 (CH), 50.01 (CH₂).

Synthèse du 4-(2,2-diméthoxyéthyl)benzène-1,2-diol (6):



Mode opératoire :

On dissout 418 mg d'aldéhyde protégé (soient 1,3 mmol) et 25 mg d'acide *para*-toluène sulfonique (soient 0,13 mmol) dans 50 ml de méthanol. La réaction est agitée pendant 1 h à température ambiante. Quand la chromatographie sur couche mince indique la disparition du produit de départ, le méthanol est évaporé et le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium aqueuse (5%), séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée. Le résidu est purifié sur colonne (éluant : 2% MeOH/CHCl₃) pour donner 134 mg de produit sous la forme de cristaux blancs, soient 0,624 mmol et 52 % de rendement.

Caractéristiques :

Formule brute : C₁₀H₁₄O₄

Masse moléculaire : 198 g/mol

Rapport frontal : 0,089 (éluant : MeOH/CHCl₃ 5:95)

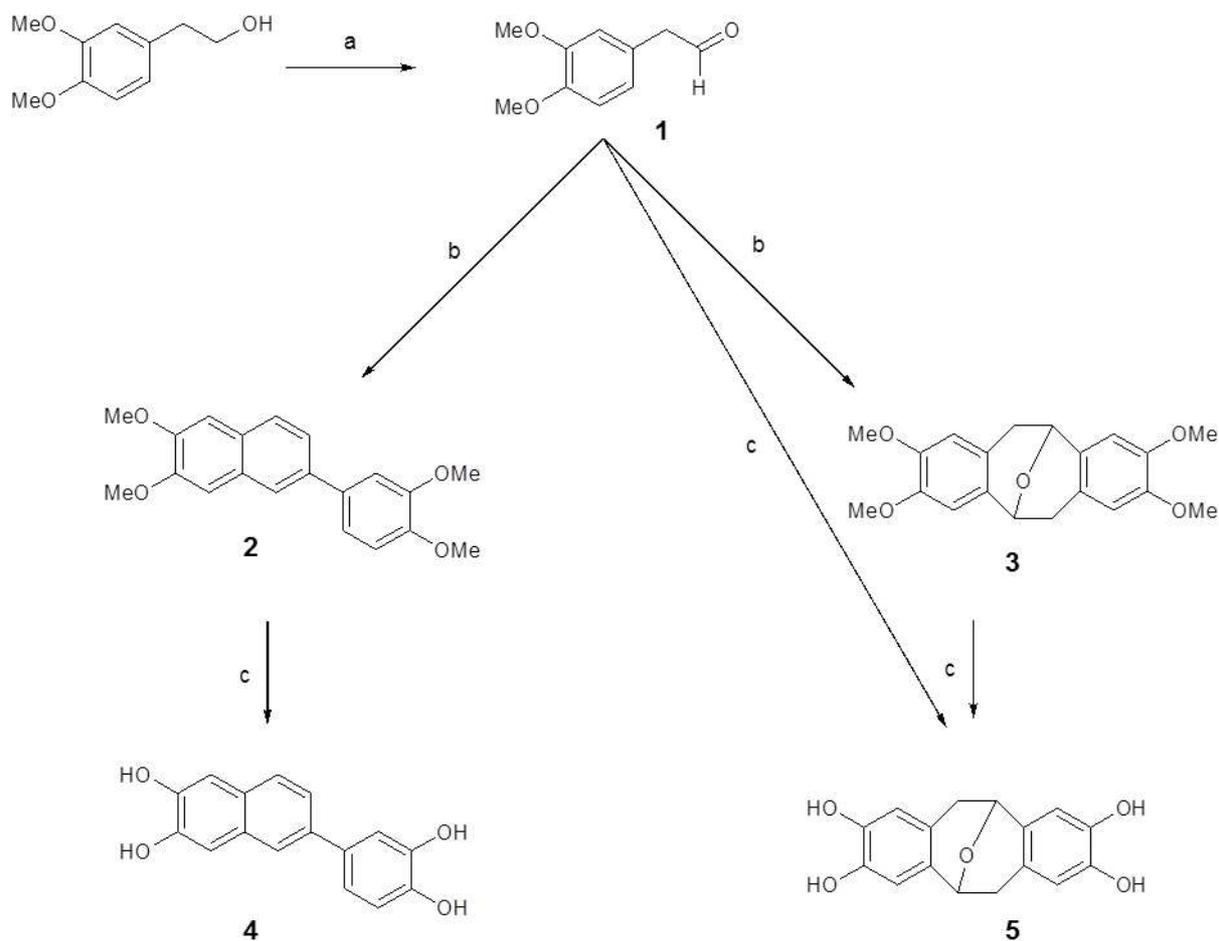
Point de fusion : 80-82°C

Analyse RMN :

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) : δ 8.72 (s, 2H), 6.63 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.43 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.23 (s, 6H), 2.65 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H).

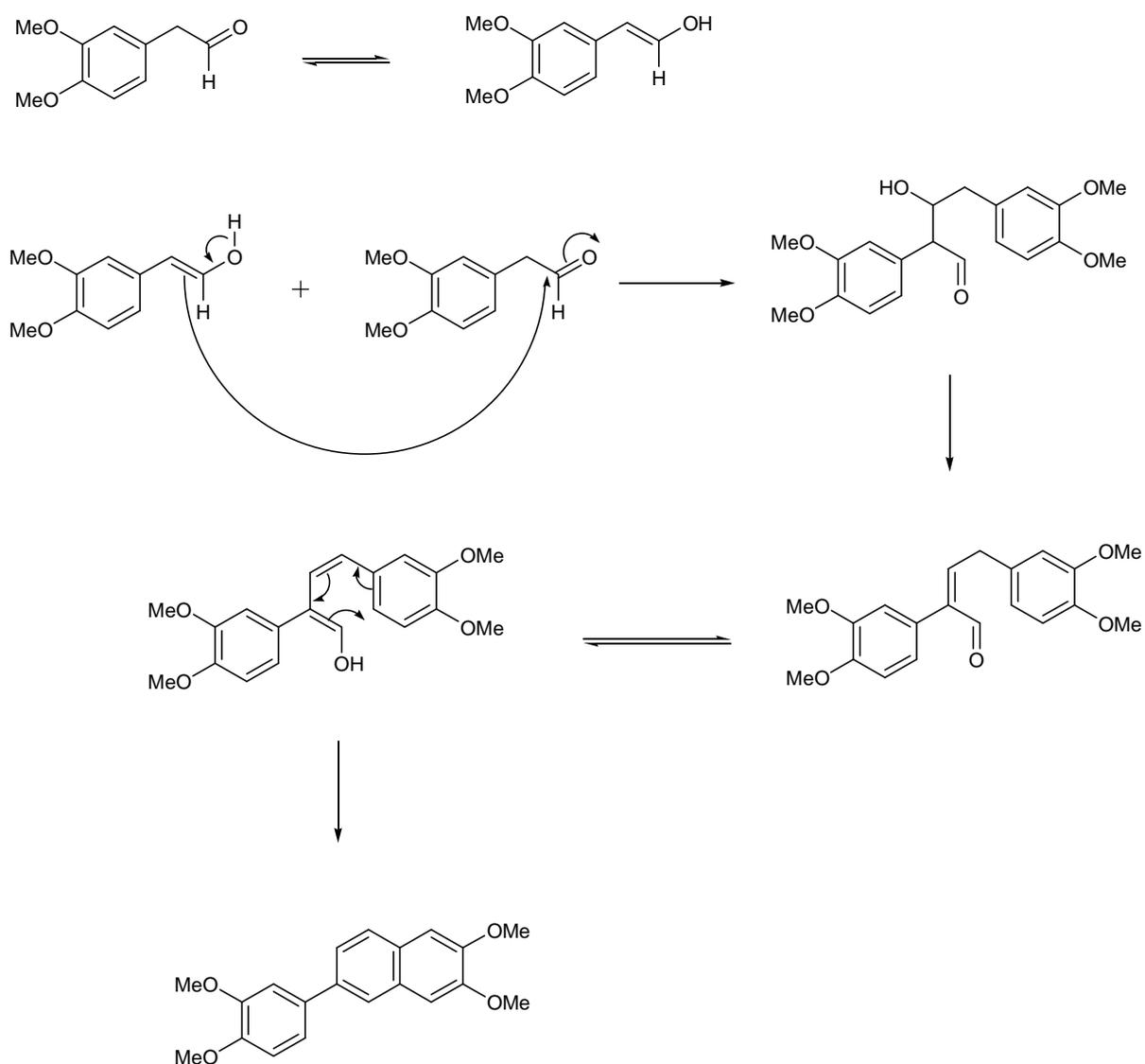
RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ 145.79 (C), 144.52 (C), 128.75 (C), 121.01 (CH), 117.75 (CH), 116.25 (CH), 105.96 (CH), 53.64 (2XCH₃), 39.17 (CH₂).

Le DOPAL est instable en milieu acide et peut conduire à des produits de dimérisation. La synthèse de ces dimères est initiée à partir du 3,4-diméthoxyphényléthanol



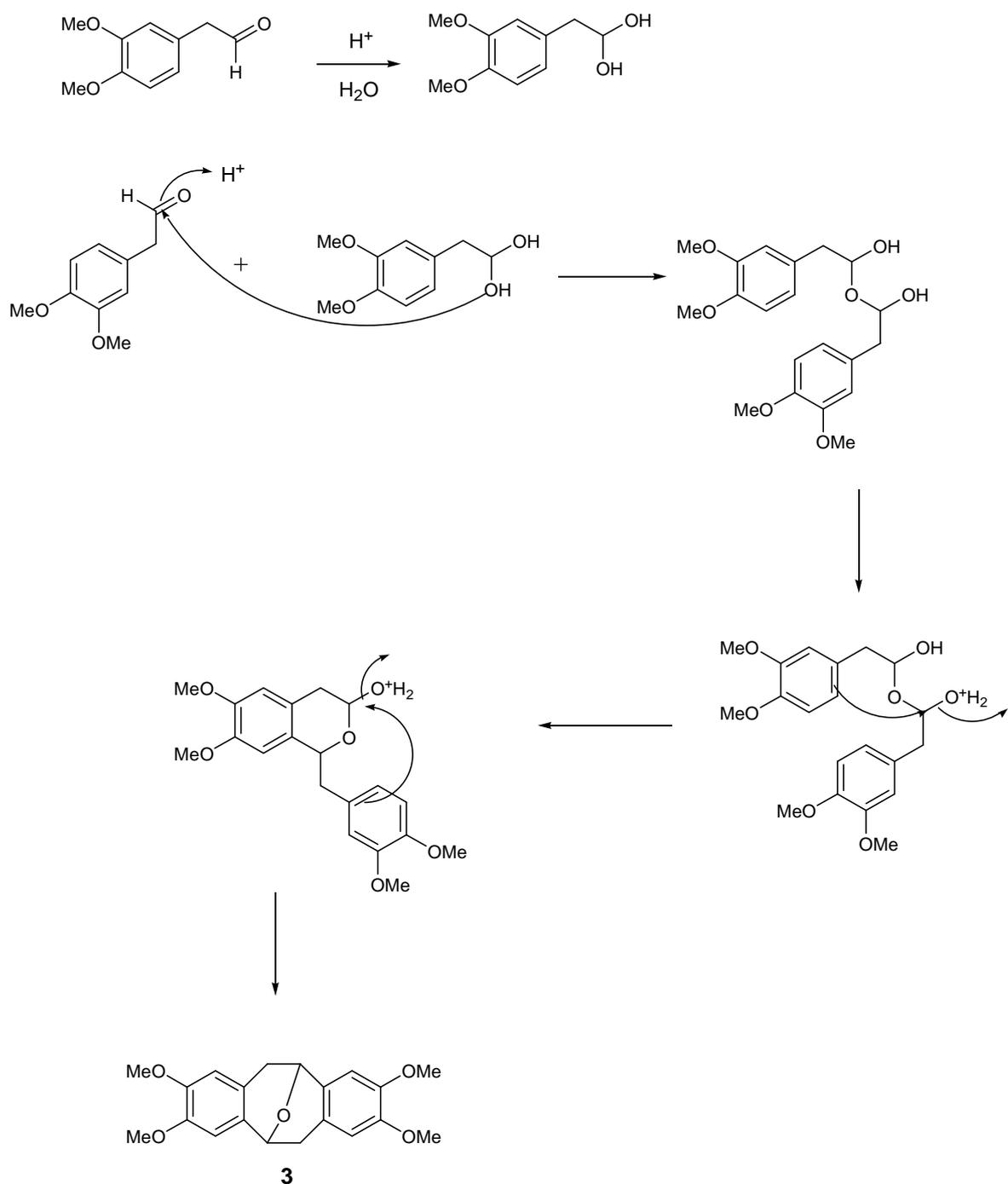
a) Dess-Martin periodinane. b) 1,4-dioxane, HCl. c) BBr₃.

La fonction alcool est oxydée tout d'abord en fonction aldéhyde **1** avec un rendement de 68%. Les composés **2** et **3** sont obtenus par traitement acide du 3,4-diméthoxyphényléthanal **1** avec des rendements en produits isolés de 31% et 21% respectivement. Cette étape est réalisée avec du 1,4-dioxane fraîchement distillé (sur sodium/benzophénone) à cause de la sensibilité de la réaction vis-à-vis des peroxydes.



A partir du composé **1**, le composé **2** s'obtient de la manière suivante :

Le mécanisme du composé **3** est présenté ci-dessous :



Les dimères du DOPAL **2** et **3** ainsi séparés subissent ensuite une déprotection effectuée à l'aide du tribromure de bore, pour donner 74% de dimère déprotégé **4** et 80% de dimère déprotégé **5**.

La synthèse du dimère **5** est directement possible à partir du 3,4-diméthoxyphényléthanal **1** traité par le tribromure de bore. Le rendement obtenu est de 82%.

5. Observation par microscopie électronique

Les échantillons agrégés sont ultra centrifugés à 100 000g pendant 30 min. Le culot est ensuite resuspendus avec 30 μ L du tampon d'origine. Puis une goutte est déposée sur une grille 150 mesh en cuivre recouverte d'une membrane de carbone pendant 30 secondes. Après séchage, de l'acétate d'uranyle 2% est déposé sur la grille pendant 1 minute. Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H600 75 kV (Hitachi Co.).

RESULTATS
ET
DISCUSSIONS

Le groupe « RMN et modélisation » s'intéresse depuis quelques années à l'étude de la protéine Tau, à ses modifications dans la DNF notamment la formation d'agrégats dans les neurones et la dérégulation de la phosphorylation. Ces deux processus dégénératifs sont observés dans un certain nombre de maladies neurodégénératives : les tauopathies.

En effet, le processus par lequel les neurones dégènèrent au sein des tauopathies est encore peu connu et il est soumis à de nombreuses études. Cependant, il existe un consensus général sur l'implication de l'agrégation de la protéine Tau dans la neurotoxicité et donc de nombreux laboratoires s'intéressent à l'inhibition de l'agrégation par le biais de petites molécules. La plupart des criblages de molécules ont été réalisés à l'aide de fragments de Tau regroupant les domaines de liaison aux microtubules et en suivant cette agrégation par la fluorescence du ThS.

Au cours de ma thèse, je me suis essentiellement intéressé à l'agrégation de la protéine Tau et à l'inhibition de ce processus. L'originalité de ce travail, repose sur l'utilisation d'une autre méthode de suivi de l'agrégation, ainsi que la découverte de nouvelles molécules anti-agrégatives et pour finir la création d'un mutant de la protéine Tau, qui permettrait de s'affranchir de la présence d'un agent réducteur au sein de la solution d'agrégation. Pour mener à bien ma thèse, nous avons :

- cherché à obtenir les meilleures conditions *in vitro* pour suivre l'agrégation de Tau par diffusion de la lumière, fluorescence et RMN.
- cherché à comprendre l'implication des cystéines dans le mécanisme d'agrégation.
- étudié, une fois ces conditions établies, l'activité de plusieurs polyphénols sur l'agrégation de la protéine Tau.

1. Mise en place des meilleures conditions d'agrégation *in vitro*

1.1 Objectifs

Depuis que nous connaissons l'implication des agrégats de Tau dans la neurodégénérescence, il est d'un intérêt évident de reconstituer le processus d'agrégation *in vitro*, dans l'espoir de comprendre ce mécanisme et de découvrir des méthodes pour empêcher ou inverser le processus. Les progrès dans ce domaine ont été assez lents à cause de deux problèmes : d'une part l'agrégation de la protéine Tau *in vitro* est très lente ; d'autre part, la structure des agrégats est mal définie au niveau moléculaire, laissant des incertitudes sur les agrégats obtenus *in vitro* (équivalence avec ceux présents dans le cerveau de patients malades).

Depuis l'année 1986, une combinaison d'avancées a permis d'améliorer l'agrégation *in vitro* :

Les premières expériences d'agrégation réalisées *in vitro* ont débuté en 1986 (Montejo de Garcini et al 1986). La première étape consistait à purifier la protéine Tau à partir de cerveau porcin. Un traitement à l'urée de la protéine Tau permettait sa polymérisation à 30°C et pH 6.4 et une grande quantité de filaments étaient observés par microscopie électronique. L'hypothèse proposée par cette équipe était que le traitement à l'urée provoquerait une désamination de la glutamine rendant une modification post traductionnelle indispensable pour permettre une agrégation (Montejo de Garcini & Avila 1987).

Ce n'est qu'en 1992, que l'équipe de Mandelkow utilisa pour la première fois une protéine Tau recombinante pour contourner le problème de purification à partir de cerveau porcin. Cette étude aborda pour la première fois le rôle des cystéines et des ponts disulfures intra et intermoléculaires. Ces derniers seraient indispensables pour la formation de dimères impliqués dans l'agrégation de la protéine Tau. Ils démontrèrent également que la forme entière de Tau (hTau23) n'entraîne pas la formation de filaments à pH acide 5.0-5.5, contrairement aux fragments K11 et K12 (Figure 22) (Wille et al 1992).

Trois ans plus tard, Schweers et collaborateurs réalisèrent une étude plus poussée sur le rôle des cystéines 291 et 322 et leurs implications dans le processus d'agrégation (Chapitre 4 § 4.3). Les échantillons furent suspendus par la technique de la goutte pendante (également utilisée en crystallogénèse), durant 7 jours à 20°C et pH 6.8. Cette étude démontra une implication importante des cystéines 322 dans la dimérisation, première étape de l'agrégation (Schweers et al 1995).

L'étude de l'agrégation *in vitro* pris un tournant majeur en 1996, lorsque Goedert et coll. décidèrent d'ajouter des polyanions, tel que l'héparine, afin d'accélérer la réaction de polymérisation (Goedert et al 1996). L'utilisation de l'héparine a rendu possible l'agrégation de Tau entier et a réduit le temps de polymérisation, en passant de quelques jours à quelques heures. Cette étude a également montré qu'une interaction entre la protéine Tau et l'héparine empêche la fixation de Tau aux microtubules. Ces résultats ont été confirmés par la suite par l'équipe de Jésus Avila, qui a étudié l'agrégation de Tau entier mais également celle de plusieurs fragments possédant les MTBR (Perez et al 1996).

En outre, des méthodes de spectroscopies ont été développées pour suivre en temps réel l'agrégation d'une faible concentration de Tau. Nous pouvons citer la mesure de la fluorescence à l'aide de la thioflavine S ainsi que la diffusion de la lumière (Friedhoff et al 1998b) ; (King et al 1999).

Puis en 1999, Goedert et collaborateurs démontrèrent que les mutations FTDP-17 n'entraînaient pas de changement de structure par rapport à Tau entier non muté. Ils montrèrent également que non seulement certaines mutations, P301L et P301S, empêchaient l'interaction avec les microtubules mais en plus elles entraînaient une formation plus importante de filaments (en présence d'héparine) que Tau non mutée et que la mutation S305N (Goedert et al 1999).

Enfin en 2001, Bhattacharya et ses collègues ont démontré qu'une concentration optimale de DTT était importante pour une bonne agrégation de la protéine Tau (Chapitre 4 § 4.4) (Bhattacharya et al 2001).

L'étude de l'agrégation *in vitro* a démontré l'existence de trois phases distinctes dans la cinétique de formation de fibres amyloïdes (Friedhoff et al 1998a, Friedhoff et al 1998b).

La première phase correspond au phénomène de nucléation (ou dimérisation). Au cours de cette phase, un pont disulfure intermoléculaire permet de former un premier dimère (ou noyau). Ce dernier permettra la formation d'oligomères, mais pas de fibres structurées en feuillets β intermoléculaires. Hortschansky et coll. ont montré que la durée de la première phase et la formation du noyau est aléatoire selon les conditions expérimentales (Hortschansky et al 2005). Ceci pourrait expliquer les différents temps de latence observés lors de nos expériences.

La seconde phase détectée correspond au phénomène d'élongation. Les protéines se fixent sur les noyaux. Nous pourrions donc observer la croissance des fibres et la formation des feuillets β intermoléculaires. Cette phase est facilement détectable et la vitesse d'élongation des fibres est aisément déterminée par les techniques de fluorescence du ThS.

La troisième phase est atteinte lorsqu'il n'y a plus de protéines monomériques en solution pour se fixer sur la fibre. Lors de cette dernière phase, il existe un phénomène de «seeding» (ou ensemencement) qui permet de restimuler l'agrégation (Knowles et al 2009) jusqu'à l'absence de monomères. A la fin de cette phase, les fibres ne peuvent plus s'allonger et un équilibre est atteint.

Ces avancées expérimentales *in vitro* pour étudier l'agrégation de la protéine Tau en filaments, ont ouvert la voie vers les études du mécanisme de formation de filaments ainsi que le développement d'inhibiteurs du processus d'agrégation.

1.2 Résultats et discussions

La découverte des mutations du gène tau en 1998 (Hutton et al 1998) au sein de la maladie DFTP-17 a montré que le dysfonctionnement de la protéine Tau peut entraîner la neurodégénérescence. En 1999, des études ont été menées pour comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ces mutations, présentes au sein du domaine de liaison aux microtubules, provoquent une démence frontotemporal. Or ces deux études ont obtenu deux résultats différents :

- D'une part l'équipe de Peter Davies démontra que la présence de mutations au sein de la séquence de Tau 441 entraînait un changement de conformation de la protéine et ces mutations lui conféraient une structure en hélice α , tel que la mutation P301L (Jicha et al 1999).
- D'autre part l'équipe d'Anthony Crowther prouva que les mutations DFTP-17 n'entraînaient aucun changement de structure de la protéine Tau mutée malgré la différence d'agrégation observée entre les différents mutants (Goedert et al 1999).

Avant de commencer à étudier l'agrégation de la protéine Tau P301L, nous avons décidé de vérifier par RMN que la mutation P301L entraîne un changement de conformation. Afin de s'assurer que les conditions expérimentales (pH, tampon, température) n'influent pas sur le positionnement des pics de corrélation des deux protéines Tau WT et Tau P301L, nous avons utilisé une expérience basée sur le schéma de l'IDIS-HSQC 1H-15N (Golovanov et al 2007). Cette expérience permet d'enregistrer de manière sélective les spectres RMN de chaque composé dans un seul échantillon contenant les deux protéines ^{15}N TauP301L et $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ TauWT. Les IDIS HSQC ont été mesurés sur un spectromètre 900 MHz Avance III Bruker équipé d'une cryosonde triple résonance.

En comparant les spectres HSQC (Figure 36), nous pouvons constater qu'il n'existe pas de différence de conformation entre la protéine **Tau non mutée** et **Tau P301L** car les pics des acides aminés de la protéine Tau P301L se superposent très bien avec ceux de la protéine Tau non mutée.

Cependant, nous avons constaté une légère baisse d'intensité des lysines présentes dans la protéine Tau P301L. Cette différence pourrait être due à un repliement des extrémités N- et C-terminale de Tau WT selon le modèle proposé par l'équipe Mandelkow (Mandelkow et al 2007), entraînant la formation d'une poche hydrophobe et une protection des lysines. Alors que la mutation P301L semble provoquer un dépliement de la protéine et une exposition des lysines sensibles au pH neutre du tampon. Ce modèle de repliement serait transitoire mais suffisant pour protéger légèrement les protons amides des lysines contre l'échange avec les protons de l'eau.

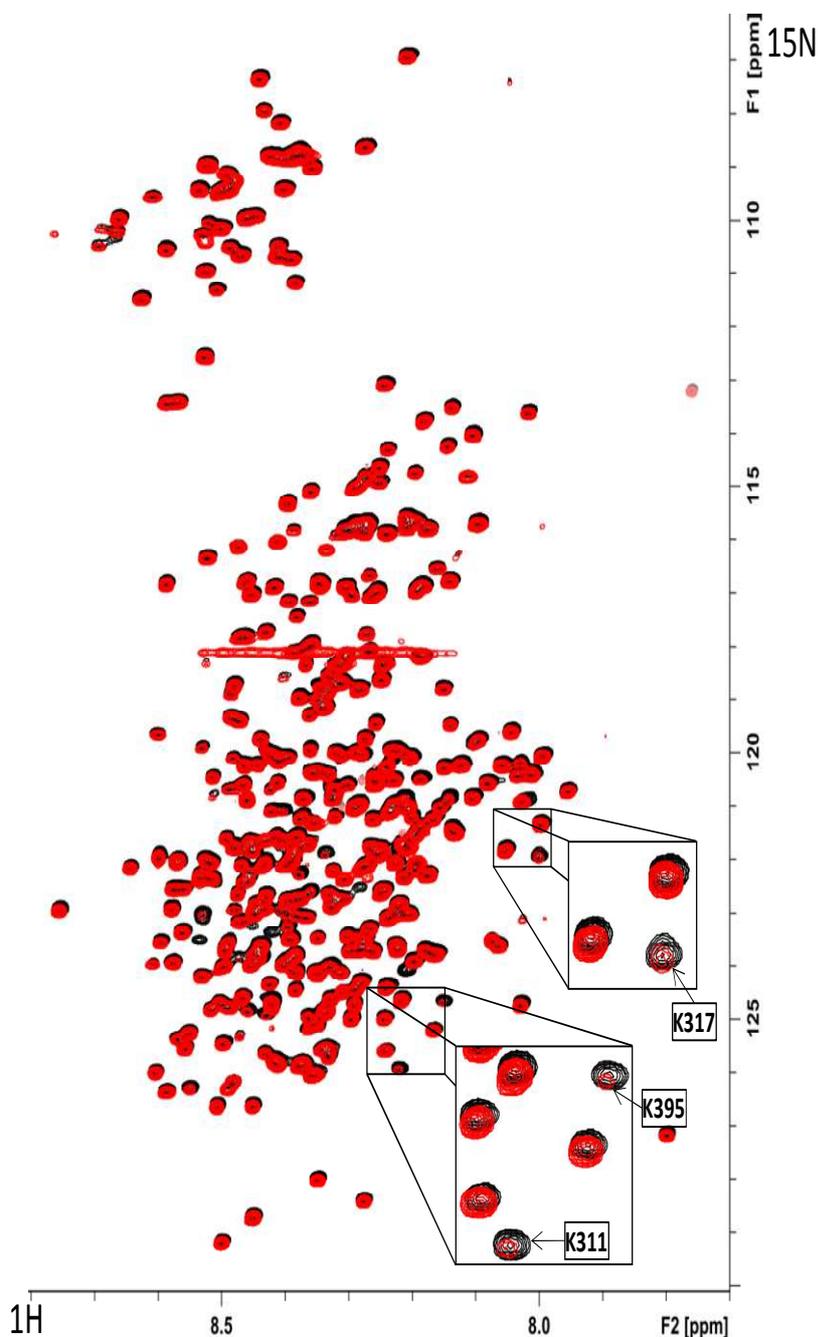


Figure 36 : Superposition des spectres HSQC des deux protéines ^{15}N **TauP301L** et $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ **TauWT**. Un agrandissement des lysines 311, 317 et 395.

Après s'être assuré que la mutation P301L n'entraînait aucun changement de conformation, nous avons voulu déterminer les meilleures conditions d'agrégation (Héparine, DTT et pH) afin d'utiliser cette protéine comme modèle d'agrégation.

1.2.1 L'implication de l'héparine dans le processus d'agrégation *in vitro* :

Pour réaliser ce travail nous avons suivi l'agrégation du mutant P301L de la protéine Tau par diffusion de la lumière sous 4 conditions : en absence d'héparine, en présence d'une concentration de 1, 5, ou 10 μ M d'héparine pour 10 μ M de protéine. La solution d'agrégation *in vitro* est composée de 10 μ M de protéine Tau P301L recombinante, d'un tampon 25mM sodium phosphate 25mM NaCl à pH6.8, de 300 μ M de DTT, et d'héparine (concentration variable), le tout incubé à 37°C sur la nuit (Figure 37).

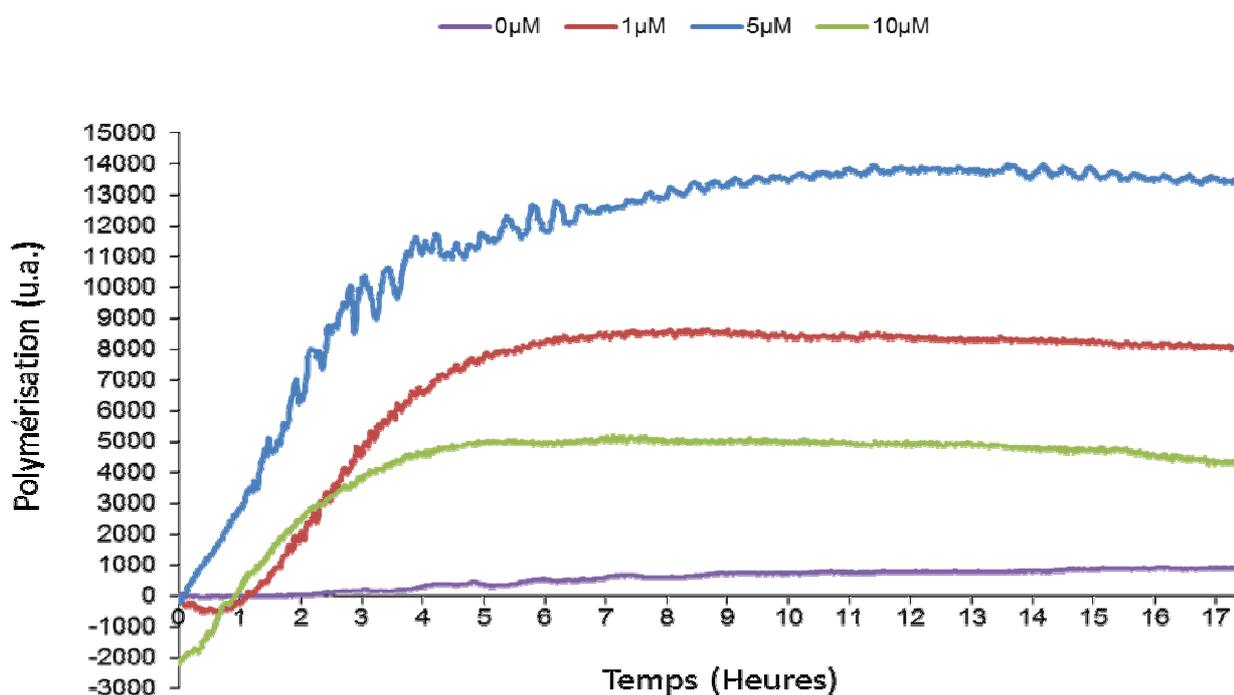


Figure 37 : Courbes représentant l'agrégation de la protéine Tau P301L à différentes concentrations d'héparine par diffusion de la lumière.

Comme le montre la figure 37, l'agrégation est plus efficace en présence de 5 μ M d'héparine car nous n'observons pas de phase de nucléation. Alors qu'une

concentration d'héparine équimolaire (10 μ M) semble perturber l'agrégation car il existe une période de mise en place de nucléation plus lente (environ 1h), de même pour une concentration d'1 μ M. Enfin, l'absence totale d'héparine ne favorise pas l'agrégation. Ces résultats confirment qu'une concentration critique d'héparine est indispensable pour une bonne agrégation *in vitro* de la protéine Tau P301L (Goedert et al 1996 ; Jeganathan et al. 2008). L'héparine permettrait un rapprochement entre les protéines Tau chargées positivement, favorisant ainsi une interaction plus importante.

Les fibres observées par microscopie électronique et force atomique (AFM) correspondent à celles retrouvées dans le cerveau de patients atteints de la MA. Elles ont une apparence torsadée avec une largeur et une périodicité des hélices d'environ 20 nm et 80 nm respectivement (Figure 38). Pour le reste de nos travaux nous avons décidé d'utiliser la concentration optimale de 5 μ M d'héparine.

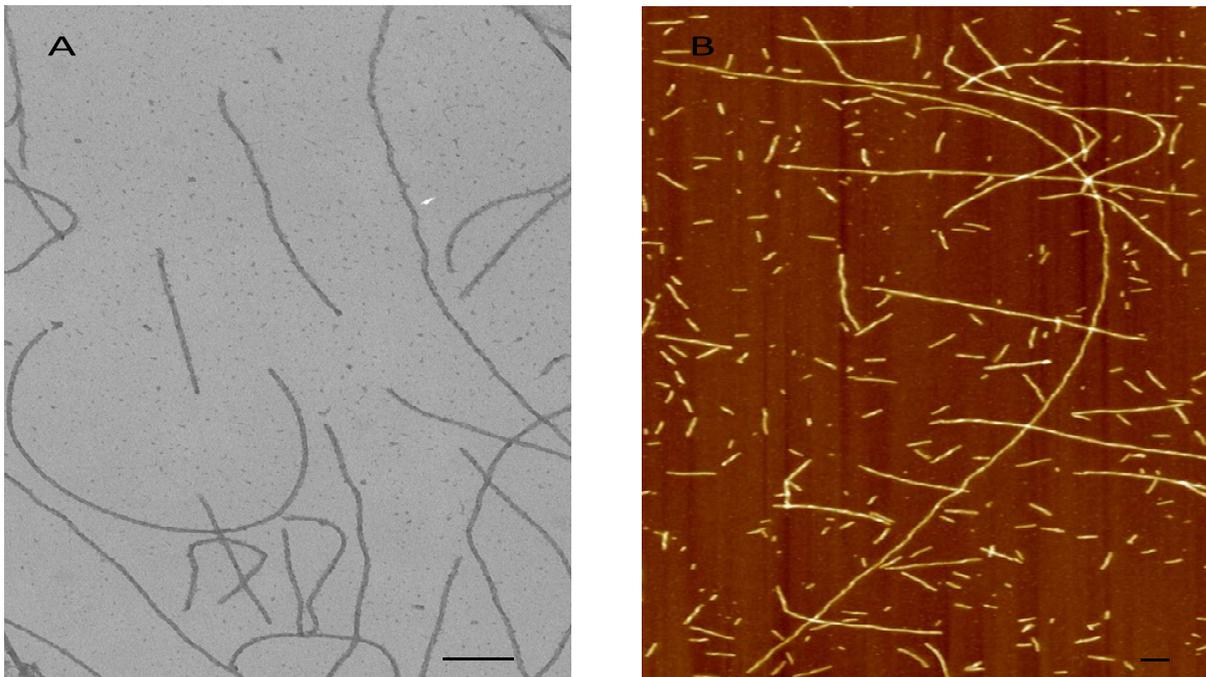


Figure 38 : Images prises par microscopie électronique (A) et à force atomique (B) représentant la protéine Tau P301L (en collaboration avec le Dr. Adamcik Jozef).

1.2.2 L'importance d'un milieu réducteur:

La deuxième étape de notre mise au point a été de vérifier que les résultats obtenus par Bhattacharya et collaborateurs s'appliquaient à notre modèle d'agrégation (Bhattacharya et al 2001). Les mêmes conditions d'agrégation que précédemment ont été utilisées tout en changeant la concentration de DTT (0, 0,3, 0,5, 1mM) (Figure 39).

La figure 39 prouve l'importance du DTT dans la solution d'agrégation car en l'absence de cet agent réducteur la polymérisation est très faible. Alors qu'une concentration élevée (1mM) présente une faible intensité d'agrégation, une concentration comprise entre 0,3 et 0,5mM s'avère suffisante pour provoquer une forte agrégation de la protéine Tau P301L.

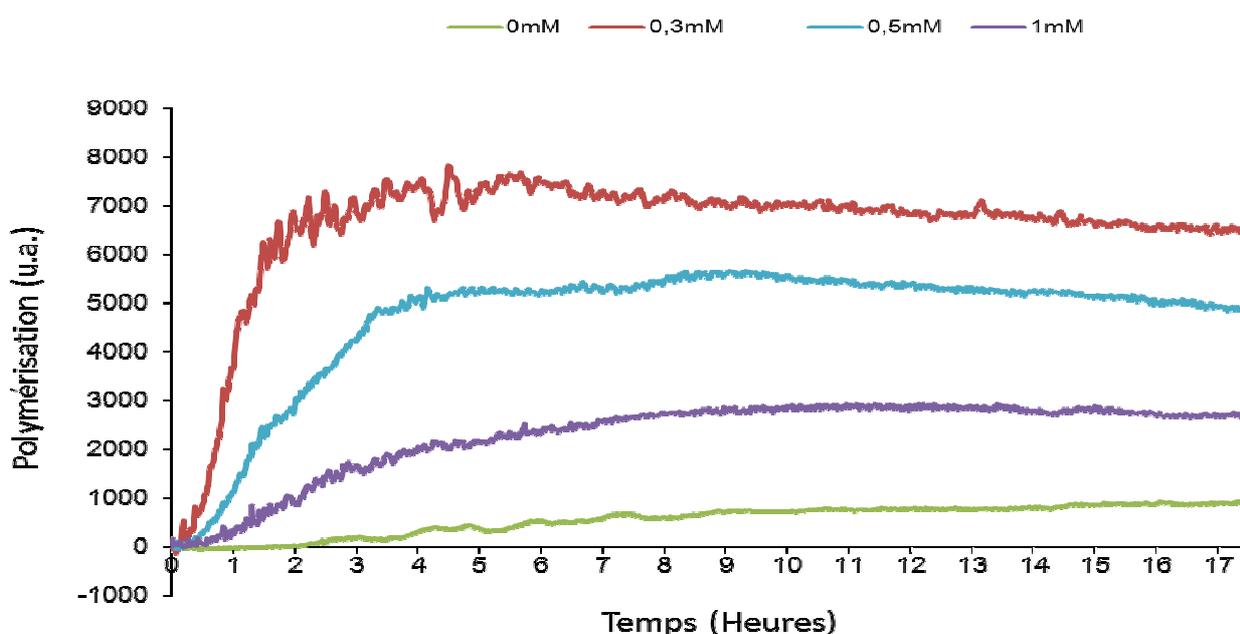


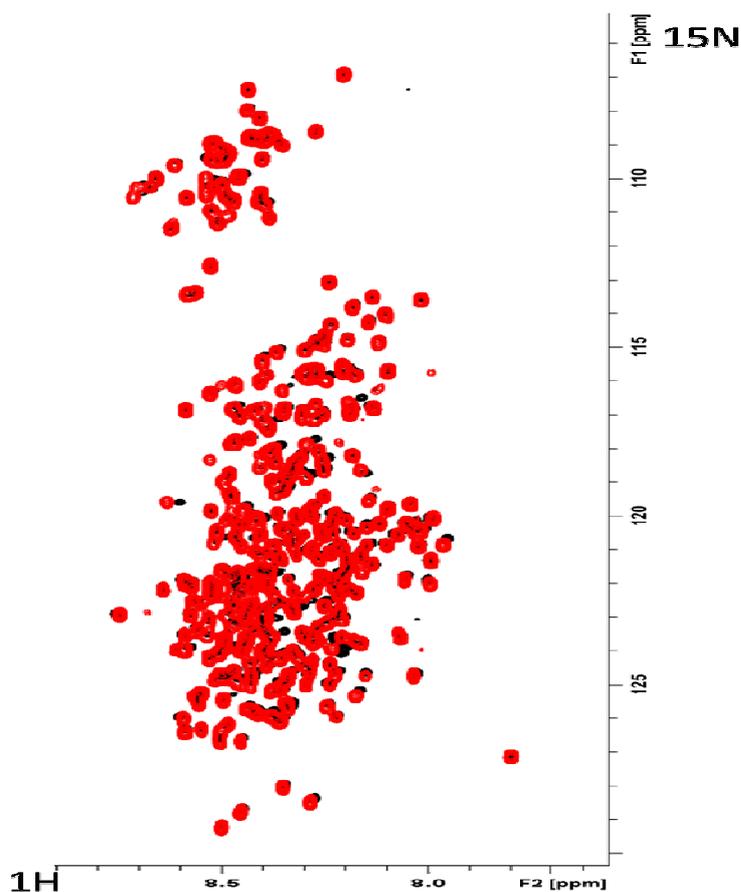
Figure 39 : Courbes représentant l'agrégation de la protéine Tau P301L à différentes concentrations de DTT par diffusion de la lumière.

Les courbes d'agrégation nous montrent que la concentration en DTT peut avoir un effet sur la vitesse d'élongation de la protéine Tau P301L. Nous constatons qu'en présence de 0,5mM et 1mM de DTT, la phase plateau est atteinte au bout de 3 et 6 heures respectivement. Alors que seulement 2 heures sont nécessaires lorsque la concentration optimale de 0,3mM est utilisée.

Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Bhattacharya et ils renforcent l'idée que l'effet réducteur du DTT est important pour favoriser l'agrégation. Une faible concentration de DTT est suffisante pour réduire le pont disulfure intramoléculaire et permettre la formation d'un pont intermoléculaire (Schweers et al 1995) qui est une étape importante dans le processus d'agrégation car ce pont intermoléculaire conduit à la formation de dimères de Tau. Une fois les phases de nucléation-dimérisation terminées, l'élongation a lieu (Friedhoff et al 1998b).

1.2.3 Choix du meilleur pH pour suivre l'agrégation :

Nous avons par la suite créé un mutant de Tau P301L sans les cystéines 291 et 322 (P301L2CS) afin de s'affranchir de problèmes liés à la faible demi-vie du DTT (Sigma-aldrich), mais également pour déterminer si la mutation P301L permet de passer outre la formation des ponts disulfures intermoléculaires nécessaire à la dimérisation.



Puis, nous avons voulu vérifier par RMN que ce mutant avait le même comportement que Tau P301L avec cystéines et qu'il était toujours déstructuré. On voit ci-dessous la superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC à 600 MHz à 20°C et pH 6.8 de Tau P301L 10 μM en **noir** et Tau P301L2CS en **rouge** (Figure 40).

Figure 40 : Superposition des spectres HSQC de **TauP301L** et **TauP301L2CS**.

Comme nous pouvons l'observer, les taches de corrélation correspondant aux acides aminés des deux protéines se superposent parfaitement entre eux, sauf pour les cystéines absentes du spectre rouge et remplacées par des sérines. Ces observations signifient qu'une mutation des cystéines n'entraîne aucun changement de conformation et cela nous permettra de tester l'agrégation de ce mutant.

L'agrégation à différents pH a été suivie comme précédemment par diffusion de la lumière pour déterminer les bonnes conditions expérimentales et par RMN pour observer l'importance de l'agrégation (Figure 41).

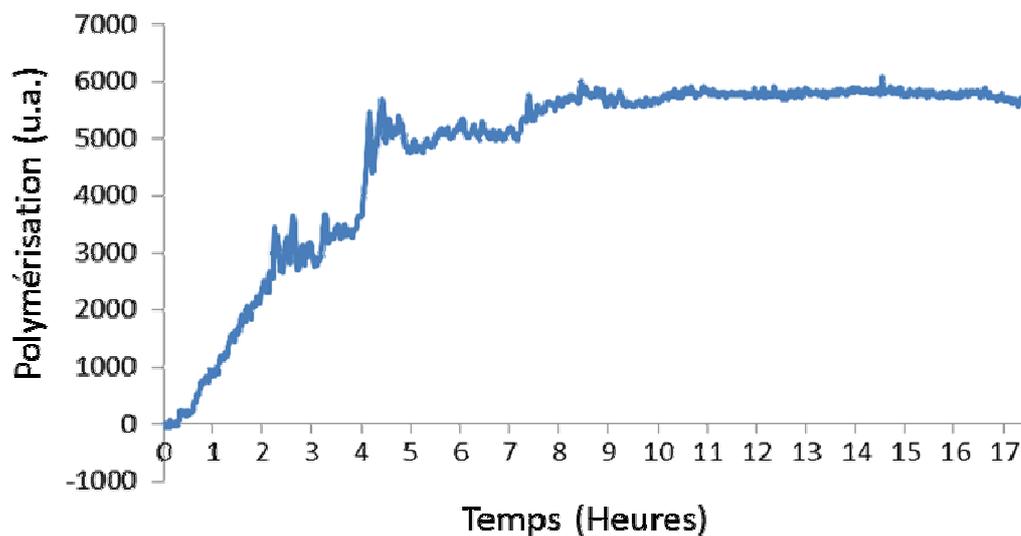


Figure 41 : Courbe représentant l'agrégation de la protéine Tau P301L2CS à **pH 6.8** par mesure de la diffusion de la lumière.

Dans un premier temps, nous avons étudié la polymérisation de Tau P301L2CS à pH 6.8 par diffusion de la lumière et l'on constate sur la courbe **bleue** ci-dessus que l'agrégation de Tau a bien lieu. Nous remarquons également que la mise en place de l'agrégation de ce mutant est plus lente (environ 6 heures) que Tau P301L. Cette différence observée ne peut être imputée aux conditions expérimentales car ce sont les mêmes que celles utilisées pour Tau P301L.

Ensuite, nous avons étudié par RMN l'échantillon de Tau P301L2CS précédemment agrégé et la superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC à 600 MHz à 20°C et pH 6.8 de Tau P301L2CS 10 μM en **noir** et Tau P301L2CS agrégé avec 5 μM d'héparine en **rouge** montre une agrégation importante (Figure 42).

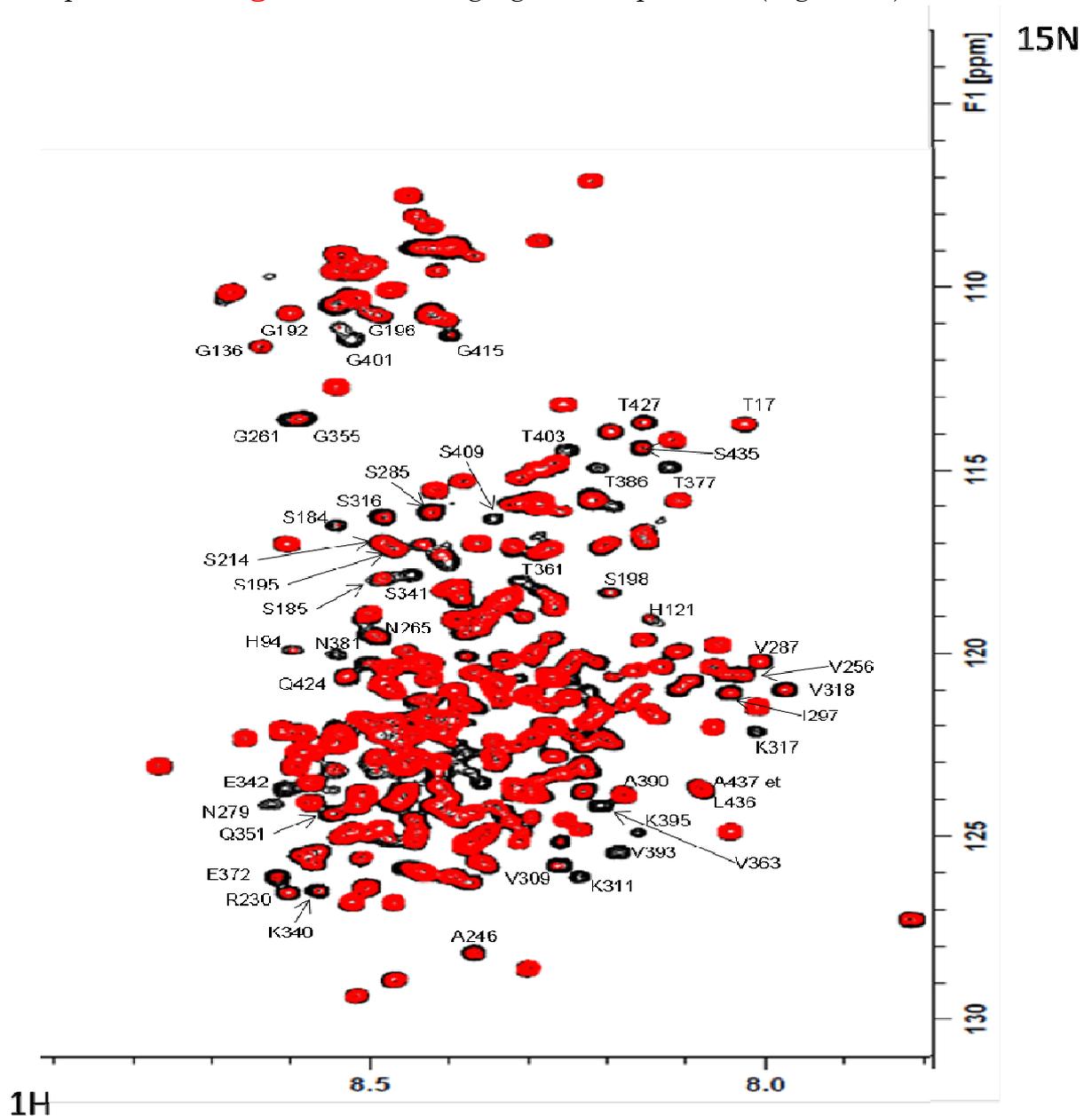


Figure 42 : Superposition des spectres HSQC des deux protéines **TauP301L2CS** et **TauP301L2CS agrégé**. Les taches attribuées correspondent aux acides aminés qui ont disparu lors de l'agrégation.

Les taches de corrélation du spectre rouge qui disparaissent sont celles qui correspondent aux acides aminés intégrés dans le cœur des fibres de Tau car ces résidus appartiennent dorénavant à un objet de haut poids moléculaire qui

dépasse les limites de détection par RMN. Ceci nous permet de délimiter la zone qui inclue le cœur des fibres (Sillen et al 2005).

A partir de **pH 4.5** dans un tampon acétate avec 25 mM de NaCl, l'agrégation de Tau P301L2CS en présence d'héparine n'a plus lieu. On voit ci-dessous la courbe d'agrégation en bleue ainsi que le spectre ^1H - ^{15}N HSQC à 37°C et pH 4,5 de Tau 10 μM incubé avec 5 μM d'héparine pendant 48h (Figure 43).

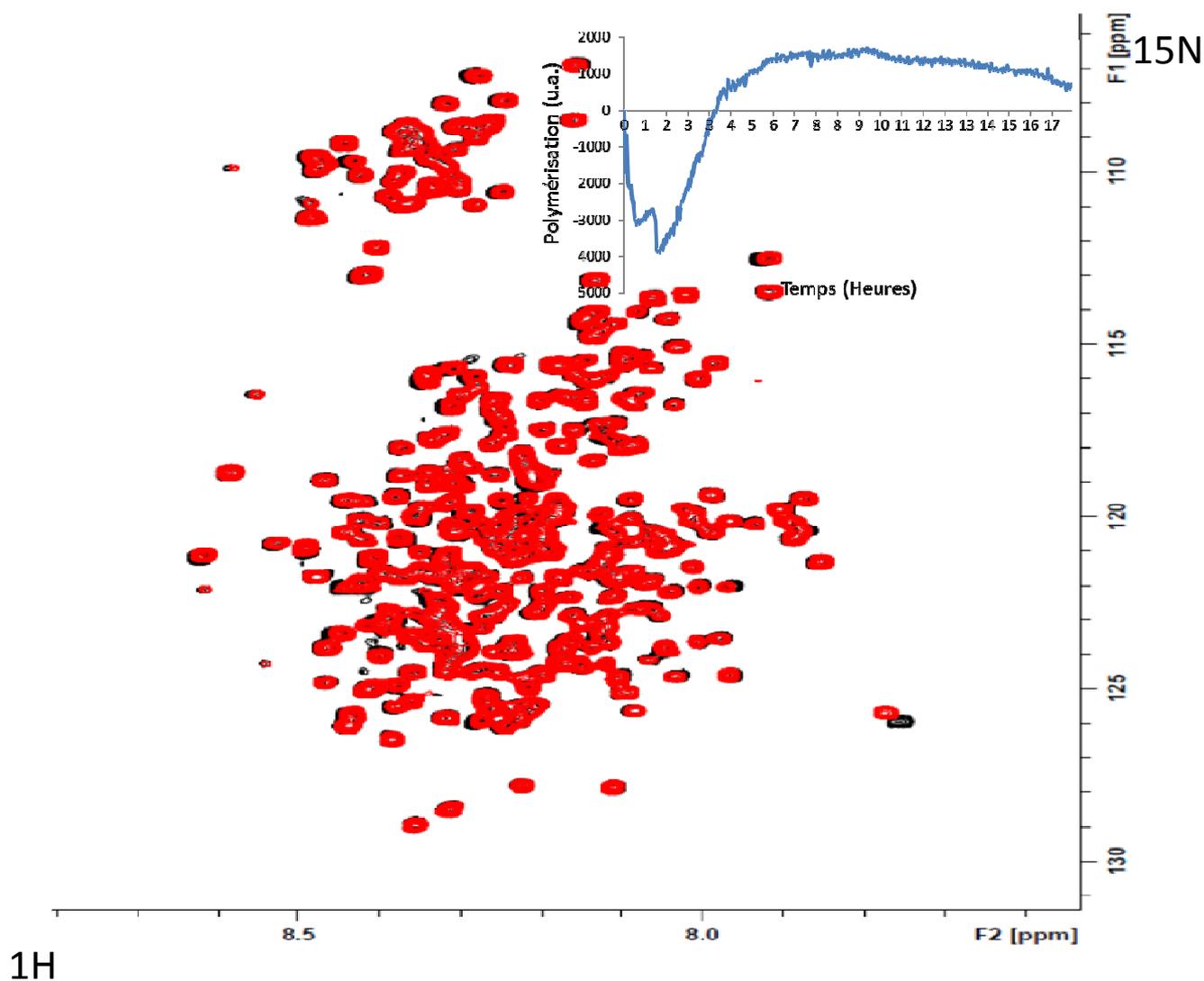


Figure 43 : Superposition des spectres HSQC des deux protéines **TauP301L2CS** et **TauP301L2CS** agrégé et la courbe d'agrégation suivie par diffusion de la lumière à **pH 4,5**.

Il n'y a pas disparition de taches de corrélation donc pas d'agrégation et ceci est confirmé par la courbe d'agrégation.

L'agrégation de Tau P301L2CS avec l'héparine a de nouveau lieu à partir de pH 5 dans un tampon phosphate. On voit ci-dessous la superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC à 37°C et pH 5,5 de Tau P301L2CS 10 μM en noir et Tau P301L2CS agrégé avec 5 μM d'héparine en bleu (Figure 44).

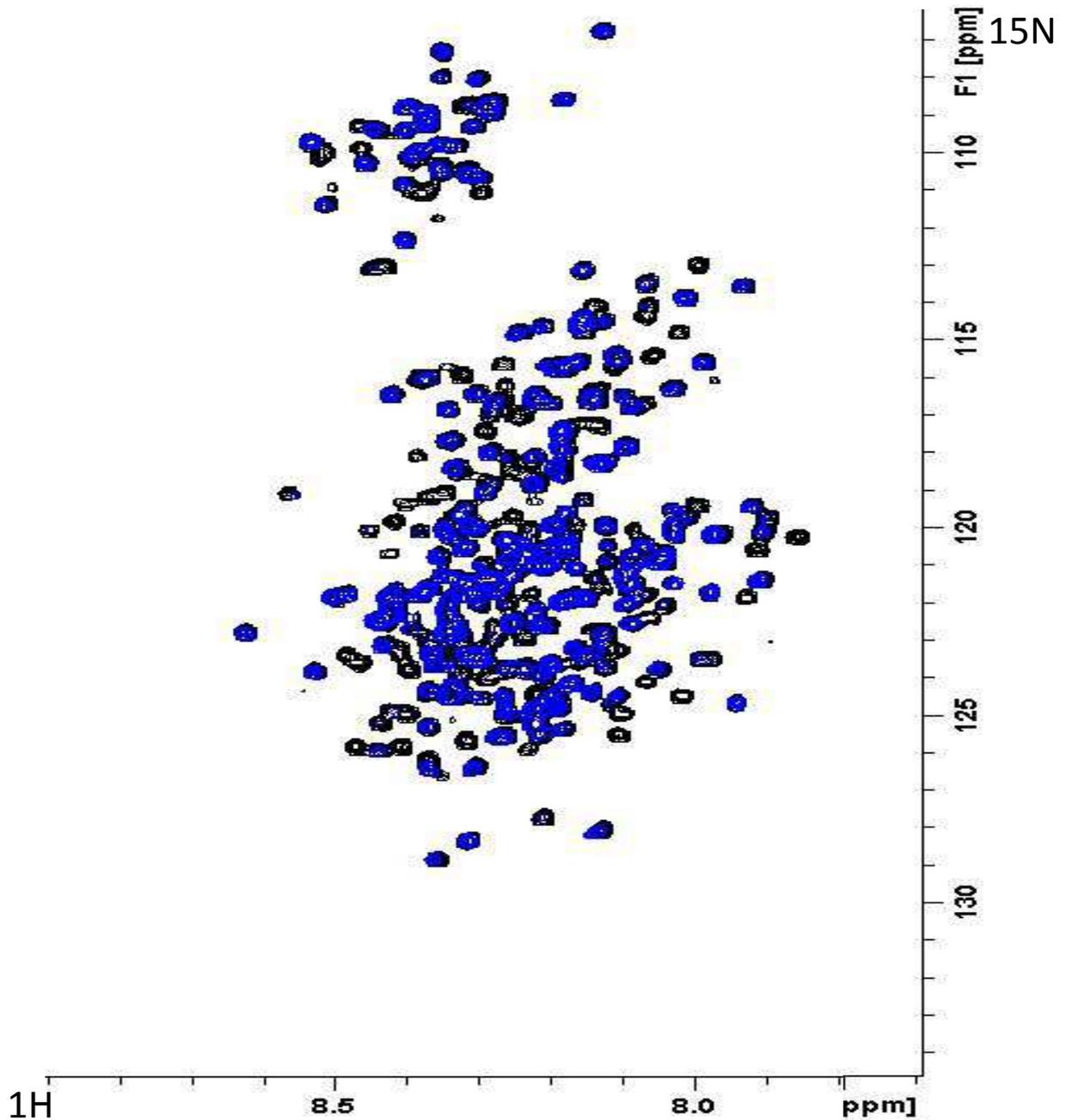


Figure 44 : Superposition des spectres HSQC des deux protéines **TauP301L2CS** et **TauP301L2CS** agrégées à pH 5,5.

L'agrégation a bien lieu, la perte d'intensité se situe dans la même zone que celle déterminée à 20°C, le cœur des fibres est bien le même. En revanche, on remarque qu'à pH 5.5 l'agrégation est plus lente qu'à pH6.8 et qu'elle est décomposée en deux phases : sûrement une phase de nucléation qui dure environ 10 heures pendant laquelle les protéines Tau P301L2CS interagiraient entre elles, puis une phase d'élongation où les fibres se formeraient et enfin une phase plateau atteinte au bout de 30 heures (Figure 45). L'interaction entre les protéines Tau peut donc se faire sans la formation de pont disulfure mais à l'aide d'autres interactions intermoléculaires dont on ne connaît pas l'origine.

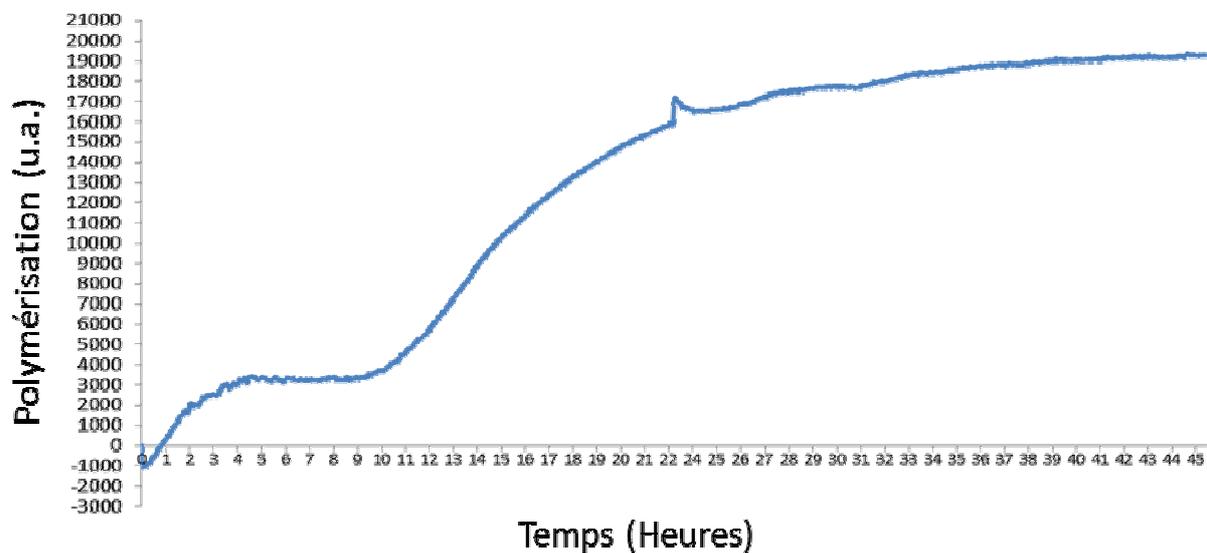


Figure 45 : Courbe représentant l'agrégation de la protéine Tau P301L2CS à pH 5,5 par diffusion de la lumière.

Le pH jouerait un rôle important dans l'agrégation *in vitro* de la protéine Tau. Les résultats obtenus prouvent qu'un pH autour de 6 est optimal pour une bonne agrégation, en accord avec l'étude réalisée par Sadasivam Jeganathan et coll. 2008. Cette différence d'agrégation observée entre les différents pH pourrait être expliquée d'un côté par l'existence d'une répulsion électrostatique à pH acide et d'un autre côté par une diminution de l'interaction protéine-polyanion à pH très basique.

1.2.4 Différence d'agrégation entre protéines Tau non mutée et Tau P301L:

Une fois les meilleures conditions d'agrégation définies (pH 6.8, 300 μ M de DTT, 5 μ M d'héparine en présence de 10 μ M de Tau P301L), nous avons testé l'agrégation de Tau 441 non mutée. Les courbes montrent clairement une différence d'agrégation entre ces deux protéines. La protéine Tau non mutée agrège moins rapidement (Figure 46) et de façon moins importante que la protéine Tau P301L (Figure 47).

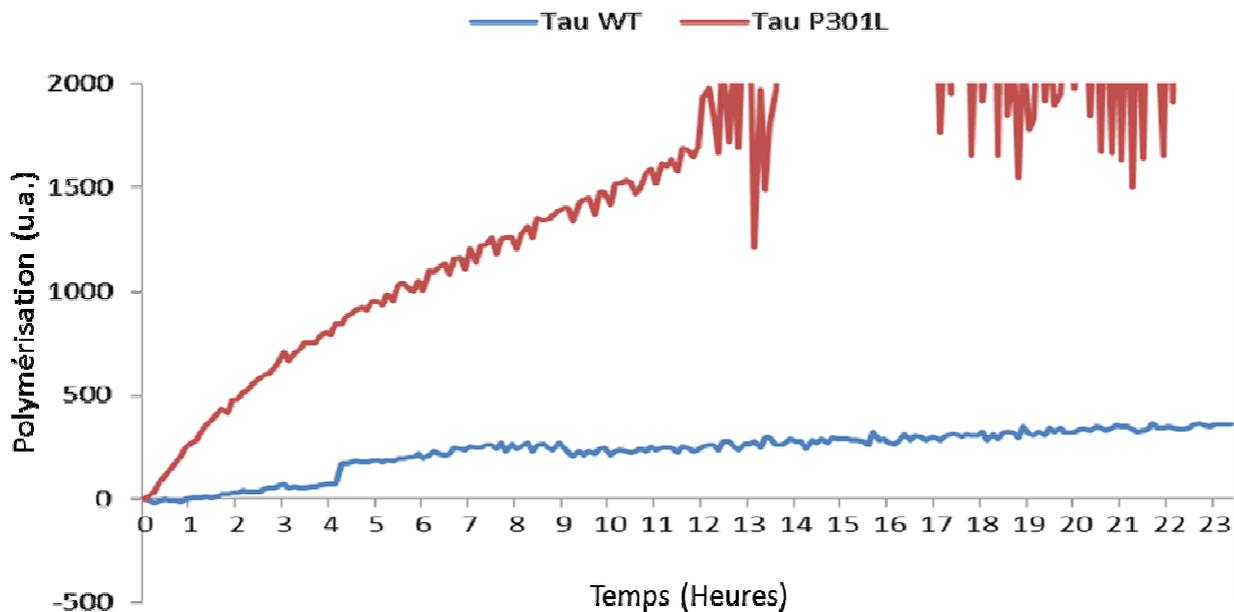


Figure 46 : Courbes représentant l'agrégation des protéines **Tau P301L** et **Tau WT** (non mutée) à **pH 6,8** par fluorescence du ThS.

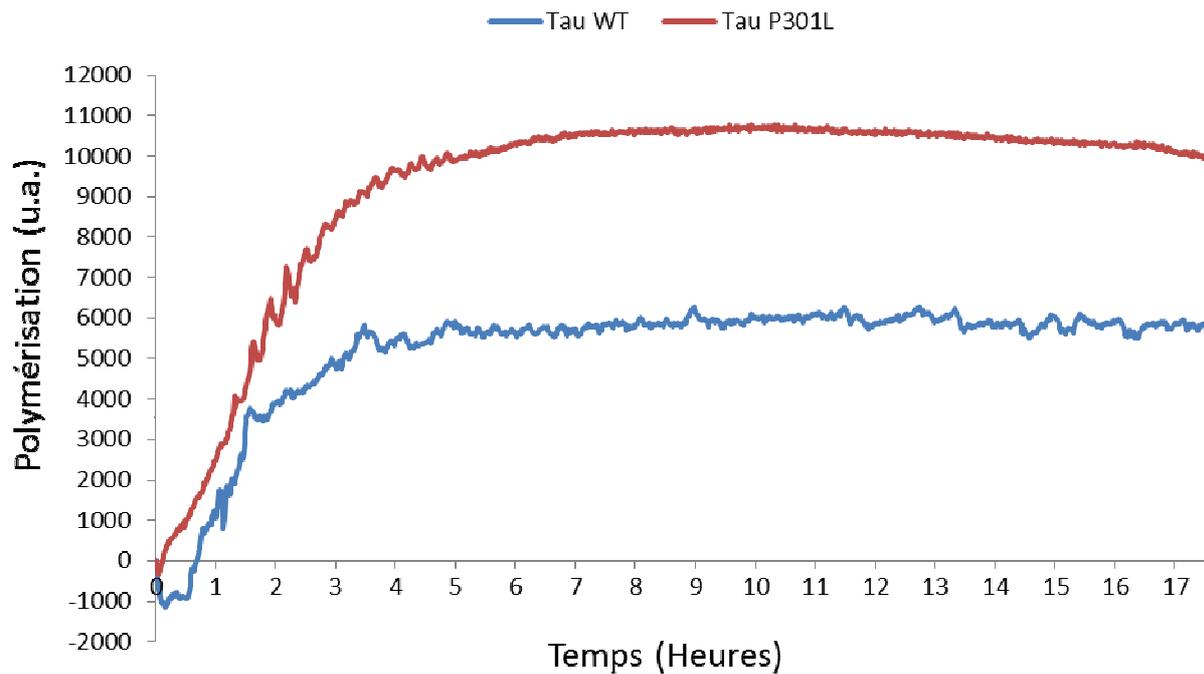


Figure 47 : Courbes représentant l'agrégation des protéines **Tau P301L** et **Tau WT** (non mutée) à **pH 6,8** par diffusion de la lumière.

Ce résultat confirme les observations faites par l'équipe de Mandelkow en 2000 sur l'agrégation du fragment K18 de la protéine Tau en présence de plusieurs mutations FTDP-17 (Barghorn et al 2000). Ils avaient en effet remarqué que lorsque K18 possédait une mutation P301L, il agrégeait plus rapidement que K18 sans mutation.

Afin d'expliquer cette différence d'agrégation entre Tau et Tau P301L, nous avons mélangé dans un même échantillon la protéine $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ Tau non mutée et $^{12}\text{C}^{15}\text{N}$ Tau P301L en présence d'héparine et étudié leurs spectres par RMN à 20°C (Figure 48A). Une titration a été réalisée en présence des deux protéines à une concentration de $40\mu\text{M}$ et d'héparine à différentes concentrations (**0**, **10**, **20** et **40** μM). Les résultats obtenus montrent qu'une concentration équimolaire d'héparine (**40** μM), provoque une baisse d'intensité des lysines présentes dans la protéine TauP301L (Lysine 25, 150) et même une disparition de celle-ci (Lysine 163, 317, 395) par rapport à la protéine TauWT.

La comparaison des spectres 1D en présence de 0 et 40 μM d'héparine de la lysine 317 (Figure 48B), nous permet de constater une chute relative de son intensité d'environ 87,5% et 60% pour la protéine TauP301L et TauWT respectivement. Ceci peut être expliqué par une interaction plus importante de l'héparine avec la protéine Tau P301L.

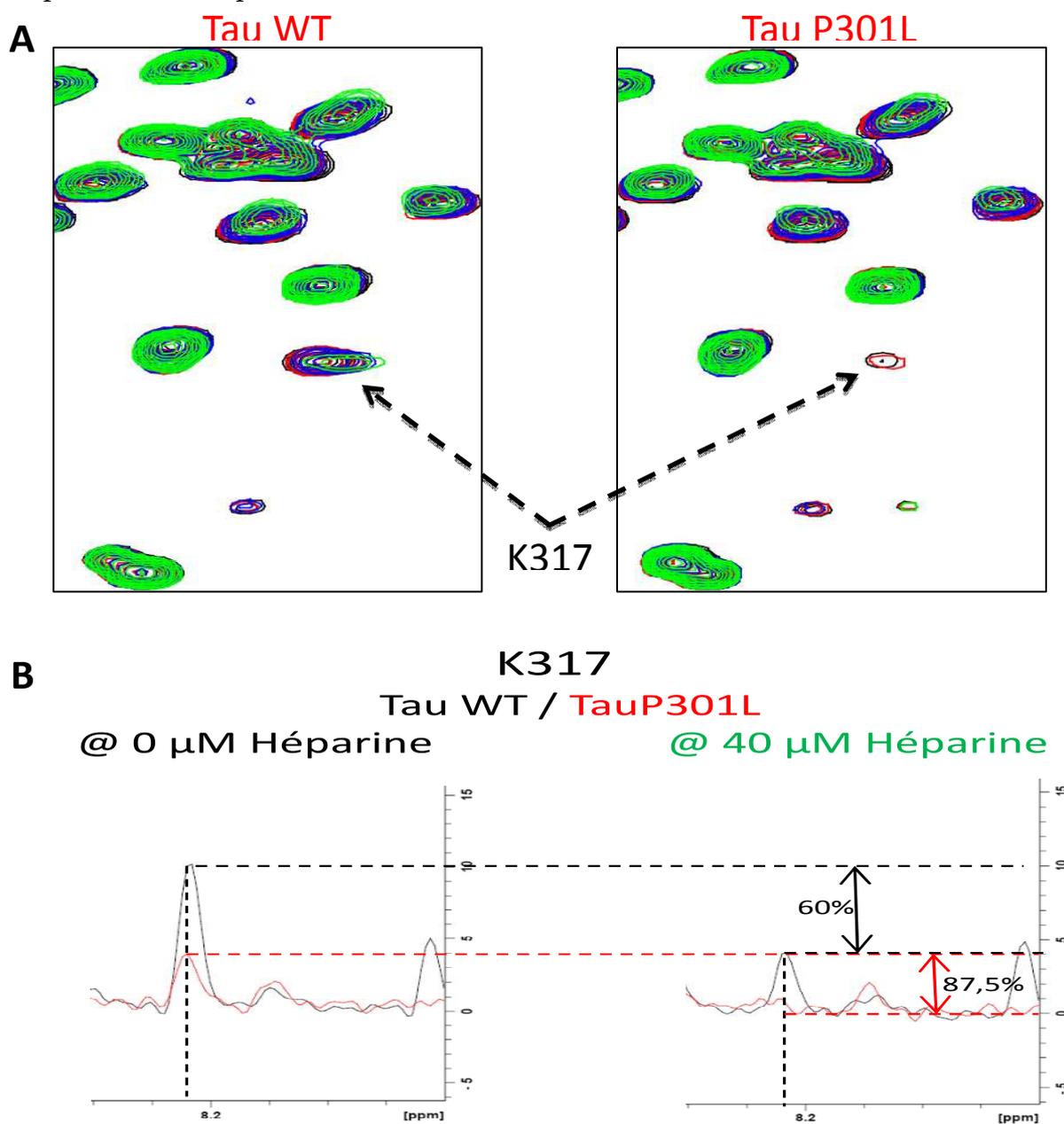


Figure 48 : A) Comparaison des spectres HSQC de **TauWT** et **TauP301L**, superposés séparément, en présence de différentes concentrations d'héparine (0, 10, 20 et 40 μM). B) Comparaison des spectres 1D de **TauWT** et **TauP301L**, en présence de 0 et 40 μM d'héparine.

Cette interaction serait facilitée par la mutation P301L, car la leucine contrairement à la proline aurait moins tendance à former de replis sous forme de tour β et/ou d'épingle à cheveux. Cette mutation faciliterait donc la formation de structure en feuillet β impliquée dans l'agrégation de Tau P301L et entrainerait une baisse d'intensité des lysines (von Bergen et al 2001, Sibille et al 2006).

1.3 Conclusion

Nos résultats contribuent à mieux comprendre le processus d'agrégation *in vitro*, car nous avons montré qu'en présence d'héparine, de DTT et dans des conditions physiologiques, à pH~7 et à 37°C, l'agrégation est optimale. De plus, lorsque la protéine Tau est mutée en P301L, l'agrégation est plus rapide et plus importante que pour la protéine Tau non mutée.

Ces résultats nous ont incités à créer un mutant de la protéine Tau P301L sans cystéines en 291 et 322 (Tau P301L2CS) pour comprendre l'importance de la mutation P301L dans le processus d'agrégation. A l'aide de ce mutant, nous avons découvert que Tau P301L2CS agrège de manière significative en l'absence totale de DTT. Cela prouve donc l'existence d'un système d'agrégation totalement indépendant de la formation de ponts disulfures intermoléculaires, considérés depuis toujours comme l'un des éléments déclencheurs de l'agrégation *in vitro* (Schweers et al 1995, Friedhoff et al 1998a).

Bien que beaucoup de progrès aient été fait pour comprendre le mécanisme d'agrégation de la protéine Tau *in vitro*, l'importance de ces découvertes reste méconnue *in vivo* comme le rôle des cystéines, du pH et des polyanions. Reste également à expliquer pourquoi la mutation P301L permet une agrégation plus rapide ? Est-ce que le dépliement de la protéine Tau provoqué par la mutation P301L permet une meilleure interaction entre deux protéines ?

2. Etude de l'agrégation sur un fragment de la protéine Tau

2.1 Objectifs

Le niveau intracellulaire des protéines est régulé par un équilibre entre leur synthèse et la dégradation. Deux systèmes protéolytiques majeurs contribuent à la dégradation des protéines dans les cellules, le système ubiquitine-protéasome et le système autophagie-lysosomale. L'identification de l'ubiquitine sur les PHFs (Perry et al 1987) dans le cerveau de patients atteints de la MA a conduit à la spéculation que le système ubiquitine-protéasome pourrait avoir un rôle important dans la dégradation de la protéine Tau. Or jusqu'à présent, nous ignorons toujours si Tau est normalement dégradée par le protéasome car certains groupes ont rapporté que l'inhibition du protéasome entraîne une augmentation du niveau de Tau (David et al 2002, Zhang et al 2005), alors que d'autres études suggèrent que Tau n'est pas dégradée par le protéasome dans les cellules neuroblastiques et chez les drosophiles (Brown et al 2005, Feuillet et al 2005).

L'autre voie majeure de la dégradation des protéines dans les cellules eucaryotes peut se faire à travers le système lysosomale, qui comprend trois voies principales pour la livraison des vésicules vers les lysosomes: macroautophagie, microautophagie et autophagie médiée par les molécules chaperones (AMC) (Mizushima et al 2008). L'altération de la voie de dégradation lysosomale dans le cerveau de patients atteints de la MA a été beaucoup décrite (Butler et al 2006, Sweeney et al 2005).

Dans les années 2000, un certain nombre de laboratoires ont montré que la protéine Tau pouvait être clivée à son extrémité carboxyterminale par la caspase 3 au cours de processus apoptotique (Fasulo et al 2000) et que ce processus était un marqueur précoce de la dégénérescence neurofibrillaire (Garcia-Sierra et al 2001). Ces travaux ont démontré qu'il existait des fragments de Tau sans les extrémités N- et C-terminales, regroupant les régions riches en proline, les domaines de liaisons au microtubule et une partie de la région carboxyterminale.

Ces formes tronquées pourraient agir comme des facteurs de nucléation dans le processus d'agrégation des protéines Tau.

Récemment, de Calignon et coll. ont mis en évidence, dans le cadre d'une étude *in vivo*, l'activation de caspases de manière préalable à la troncation de Tau et à la formation d'agrégats (de Calignon et al 2010). Dans ce modèle, l'activation des caspases serait transitoire et aurait un rôle d'amorce de l'agrégation. Les formes tronquées générées recruteraient alors les formes entières de Tau, induisant par là même leur mauvaise conformation et leur agrégation.

Or dernièrement, notre équipe a découvert un fragment F4 de la protéine Tau qui possède une affinité pour les microtubules encore plus importante que le MTBR seul, permettant ainsi une meilleure stabilisation. Ce qui démontre que le MTBR n'est pas le plus important fragment impliqué dans l'assemblage des microtubules (Yao et al 2003). Le fragment F4 possède une partie de la région riche en proline P2, les domaines de fixation aux microtubules R1-R2 et une partie de R3 (Figure 49) (Fauquant et al 2011).

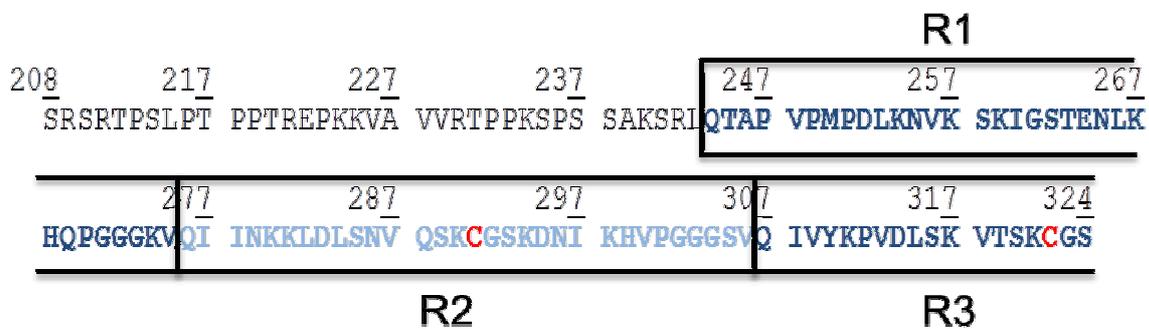


Figure 49 : Séquence de Tau F4.

L'étude ci-après, nous a permis de suivre la capacité d'agrégation du fragment F4 et de ces différents mutants.

2.2 Résultats et Discussions

L'aptitude du fragment Tau F4 à agréger en présence d'héparine a été suivie par fluorescence au ThS à 37°C, pH 6.8 et avec différentes concentrations de DTT (Figure 50).

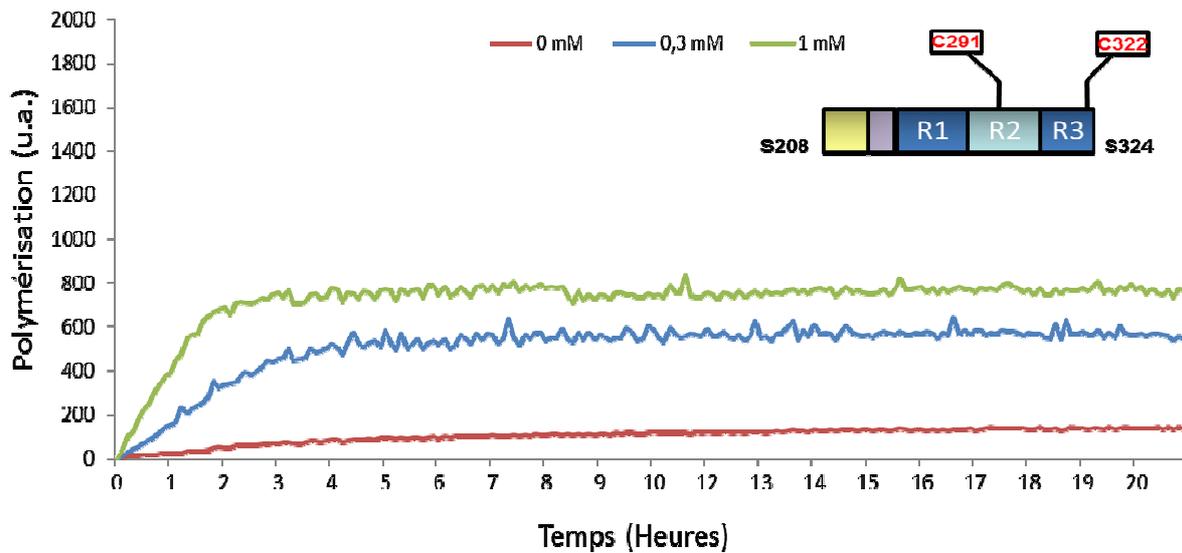


Figure 50 : Courbes d'agrégation de Tau F4 en présence de différentes concentrations de DTT (0mM, 0.3mM, 1mM) et la représentation schématique du fragment Tau F4, par fluorescence du ThS.

Les courbes ci-dessus montrent qu'une agrégation du fragment F4 est possible *in vitro* mais nécessite une forte concentration en DTT pour rompre les ponts disulfures intramoléculaires pouvant se former.

Afin de vérifier l'importance des Cystéines dans le processus d'agrégation, nous avons créé deux mutants du fragment Tau F4 qui ne possèdent qu'une seule cystéine : Tau F4 C322S et Tau F4 C291S (Figure 51).

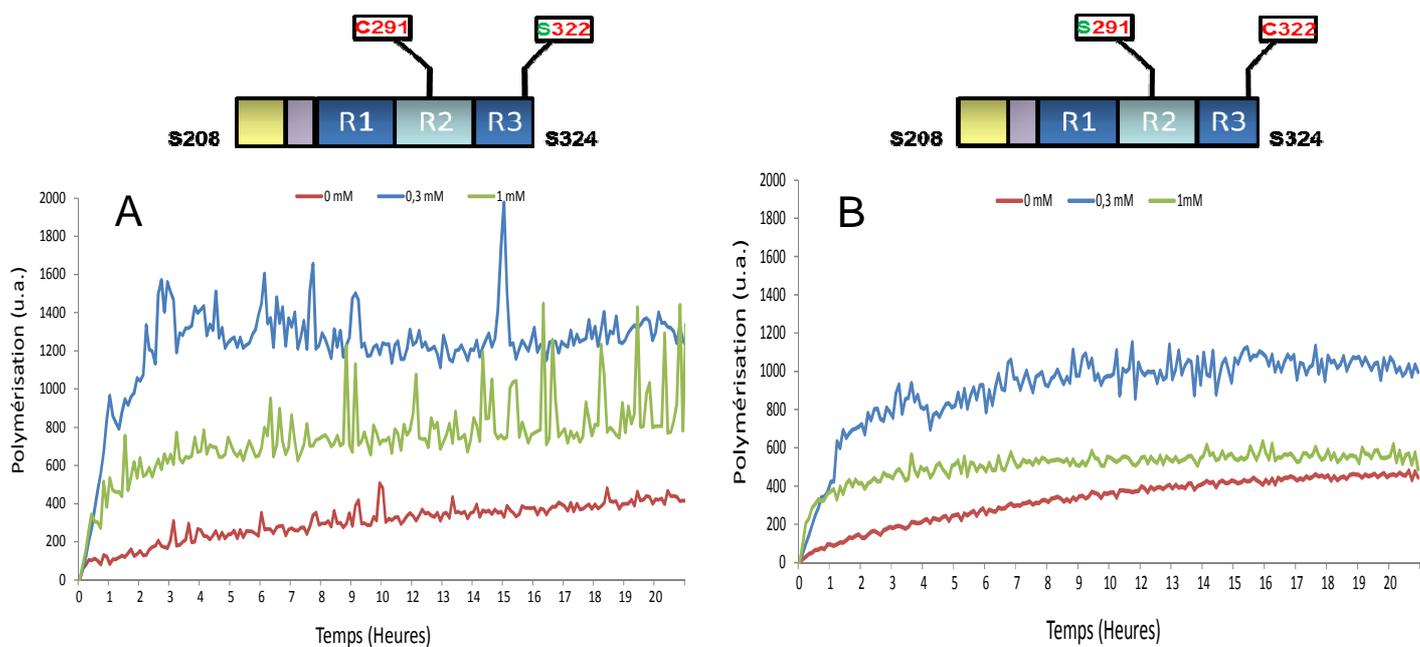


Figure 51 : Courbes d'agrégation de Tau F4 C322S (A) et Tau F4 C291S (B) en présence de différentes concentrations de DTT (0mM, 0.3mM, 1mM) et la représentation schématique de ces fragments, par fluorescence du ThS.

Les courbes d'agrégation montrent que les mutants Tau F4 C322S et Tau F4 C291S agrègent différemment en fonction de la concentration en DTT. L'agrégation est moins importante à une concentration élevée de DTT (1mM) par rapport à une concentration de 300µM. Alors qu'en l'absence de DTT, l'agrégation est moindre (Tau F4 S291C, Tau F4 C291S).

Nous avons voulu mieux comprendre le rôle d'une éventuelle dimérisation de la protéine Tau par les cystéines. Pour cela, nous avons créé d'abord le mutant Tau F4 sans cystéines (Tau F4 C322S C291S), mais nous avons également inséré une seule cystéine à d'autres endroits du fragment Tau F4. Pour le fragment qui ne présente aucune cystéine, la présence de DTT à des concentrations différentes ne semble pas affecter son agrégation. Cette constatation s'applique également aux mutants Tau F4 avec une Cystéine en 221, et celui avec une cystéine en 208 (Figure 52) car ces mutants agrègent de la même manière en l'absence ou en présence de 300µM et de 1mM de DTT.

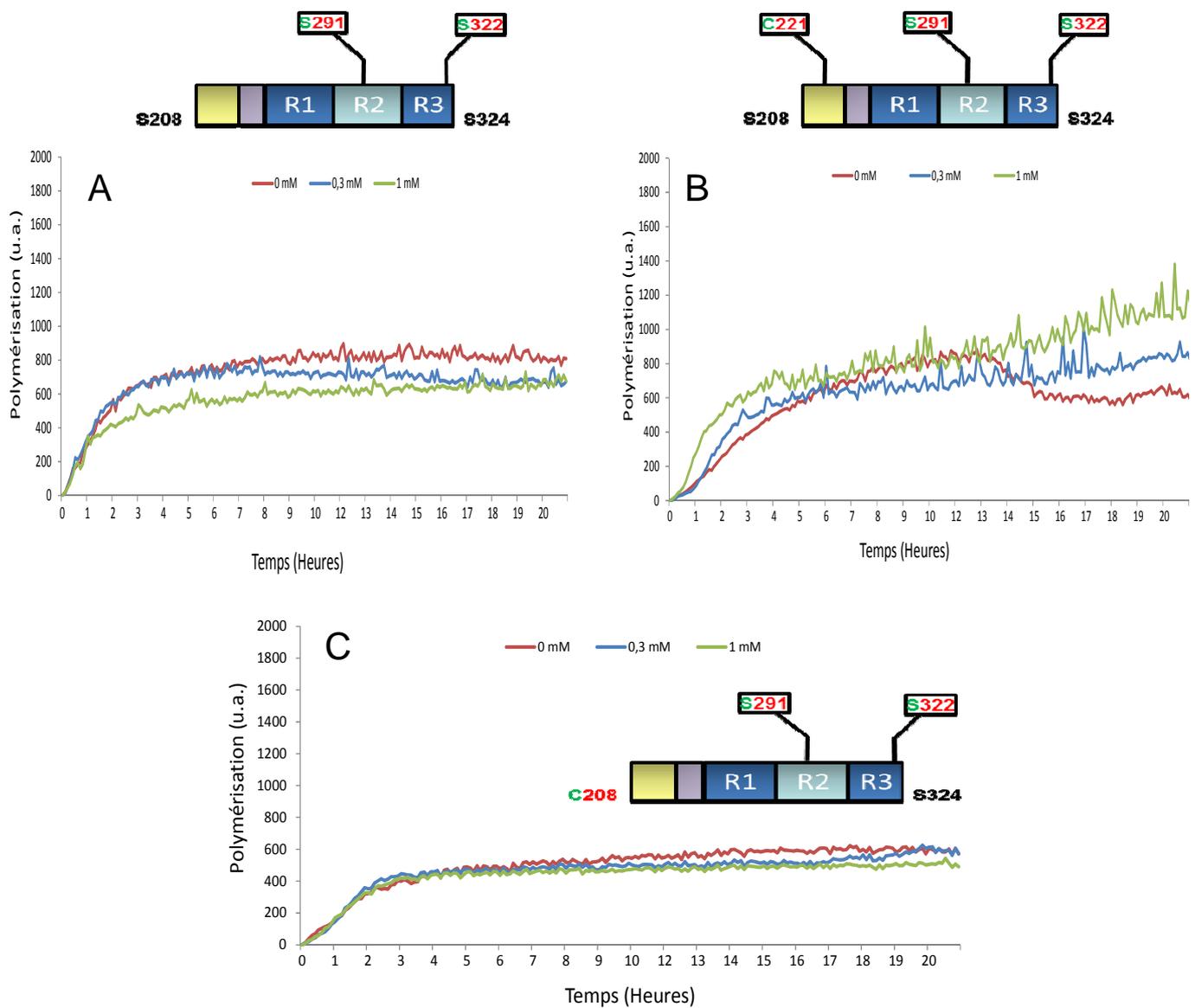


Figure 52 : Courbes d'agrégation de Tau F4 C322S C291S (A), Tau F4 R221C C291S C322S (B) et Tau F4 S208C C291S C322S (C) en présence de différentes concentrations de DTT (0mM, 0.3mM, 1mM) et la représentation schématique de ces fragments, par fluorescence du ThS.

Nous avons également voulu savoir si deux cystéines présentes à chaque extrémité du fragment pouvaient influencer l'agrégation. Nous avons observé que le mutant avec deux cystéines en 208 et 322 agrège mieux en présence d'1mM de DTT (Figure 53).

Il semblerait donc qu'un pouvoir réducteur plus important soit nécessaire pour rompre ce pont disulfure qui relie les deux extrémités de la chaîne polypeptidique. Une fois ce pont rompu, la protéine pourrait se déplier et permettre un pont intermoléculaire avec une autre protéine.

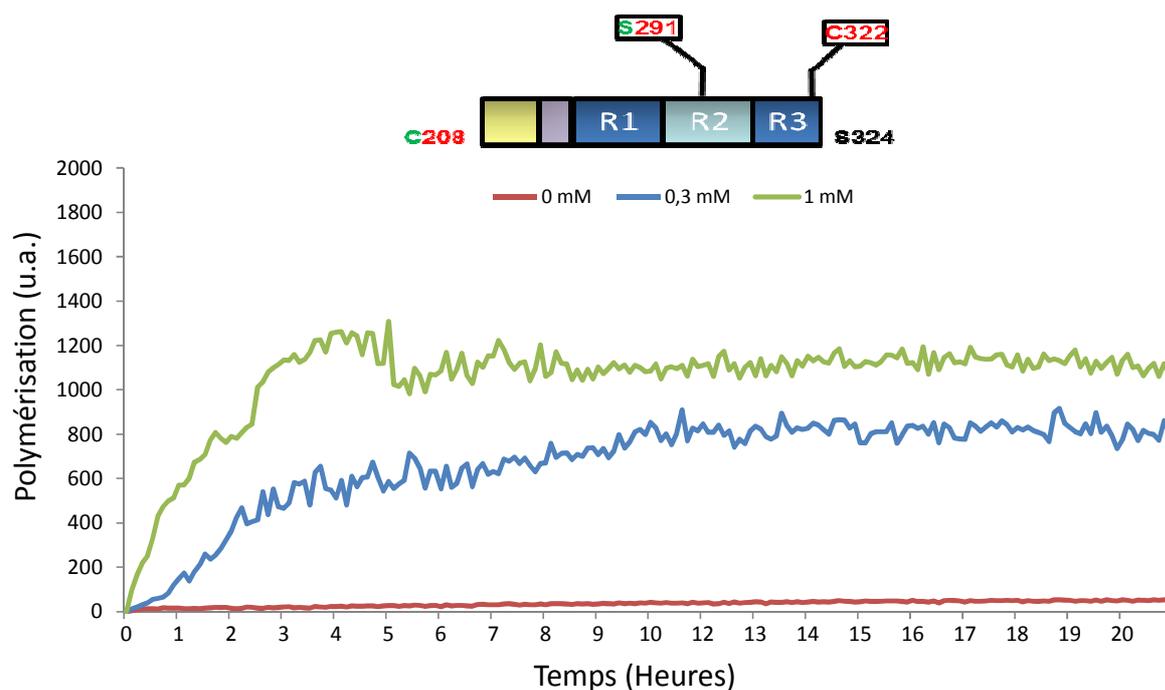


Figure 53 : Courbes d'agrégation de Tau F4 S208C C291S en présence de différentes concentrations de DTT (0mM, 0.3mM, 1mM) et la représentation schématique de ce fragment, par fluorescence du ThS.

Ces résultats suggèrent que les cystéines serviraient de système de protection contre l'agrégation car lorsque le fragment Tau F4 est dépourvu de cystéines, l'agrégation a lieu en absence d'un agent réducteur contrairement au mutant qui possède les cystéines 291 et 322.

Quant à l'agrégation des fragments qui ne possèdent qu'une seule cystéine, elle semble dépendre de la position de cette cystéine. Nous avons constaté que le DTT n'avait aucun effet sur l'agrégation lorsque la cystéine est présente en 208 (Tau F4 S208C C291S C322S) ou en 211 (Tau F4 R221C C291S C322S) car ces deux mutants agrègent de la même manière quelle que soit la concentration en DTT. En revanche, les fragments Tau F4 qui présentent leur cystéine en 291 (Tau F4 C291S) ou en 322 (Tau F4 C322S) agrègent plus efficacement en présence de DTT.

2.3 Conclusion

L'étude des fragments Tau F4 nous a permis de mieux comprendre l'importance des cystéines et des ponts intra et inter-moléculaires. Les résultats obtenus montrent tout d'abord l'existence d'un système de protection basé sur la présence des cystéines en 291 et/ou 322 spécifiquement, qui empêchent une agrégation efficace du fragment Tau F4 en l'absence de DTT.

Nous avons également observé une agrégation du fragment Tau F4 sans mutation en P301L, sans cystéines et sans agitation. Ceci prouve qu'il existe un système d'agrégation cystéines-indépendant qui viendrait compléter l'hypothèse selon laquelle les ponts disulfures inter-moléculaires sont nécessaires pour une bonne agrégation (Schweers et al 1995). Mais ça veut également dire que les cystéines pourraient jouer un double rôle selon les conditions cellulaires, soit le milieu intra-cellulaire est suffisamment réducteur pour permettre la formation d'un pont intermoléculaire, soit la protéine Tau forme un pont intramoléculaire empêchant ainsi une dimérisation et donc le processus d'agrégation.

Enfin, le système d'agrégation cystéines-indépendant serait dépendant du domaine riche en proline (ou Proline Rich) et plus performant que la dimérisation par les cystéines. Car l'étude que nous avons réalisée sur le fragment K18 (dépourvu du domaine Proline Rich) présente une phase de nucléation beaucoup plus importante que le fragment Tau F4 (pourvu du domaine Proline Rich) malgré la présence des Cystéines en 291 et 322 (Figure 54).

A la participation du domaine Proline Rich dans la stabilisation des microtubules (Fauquant et al 2011), vient s'ajouter son implication dans le processus d'agrégation. La découverte de ce phénomène permet d'imaginer la présence de deux mécanismes complémentaires lors de la phase de nucléation, l'un cystéines-dépendants et l'autre Proline Rich-dépendant.

Ces expériences nous ont permis de déterminer les meilleures conditions d'agrégation *in vitro* afin de tester des molécules anti agrégatives par diffusion de la lumière et fluorescence du ThS. Mais également de créer des mutants Tau P301L2CS, Tau F42CS etc. qui seront des outils importants pour suivre

l'agrégation par RMN car nous pourrions nous affranchir du DTT considéré comme facteur limitant à cause de sa demi vie (Sigma-Aldrich). Ces mutants nous permettront par la suite de déterminer les sites d'interactions entre nos molécules anti agrégatives et la protéine Tau.

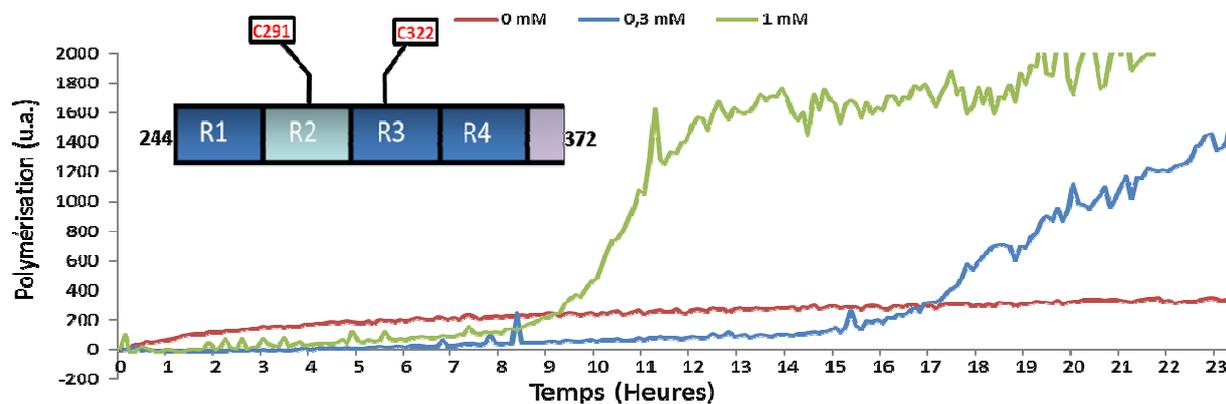


Figure 54 : Courbes d'agrégation de Tau K18 en présence de différentes concentrations de DTT (0mM, 0.3mM, 1mM) et la représentation schématique de ce fragment, par fluorescence du ThS.

3. La capacité anti agrégative de molécules naturelles polyphénoliques.

3.1 Objectifs

L'équipe de chimie organique et médicinale de l'EA 4478 possède une grande expérience dans le domaine de la synthèse de polyphénols naturels ou synthétiques et dans l'étude de leurs propriétés biologiques (antioxydants, antivirales).

Une fois la mise au point de l'agrégation *in vitro* terminée, nous nous sommes intéressés à son inhibition. Pour cela, nous avons testé plusieurs molécules naturelles polyphénoliques issues de plantes de médecine traditionnelle et/ou de plantes culinaires. Nous avons choisi de travailler avec des molécules phénoliques car elles prennent une importance croissante dans la recherche, grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Dragsted 2003). En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la lutte contre les maladies neurodégénératives (Orgogozo et al 1997), cardiovasculaires (Frankel et al 1993) et le traitement du cancer (Chen et al 2004). Le régime méditerranéen est de plus en plus étudié pour ses effets bénéfiques sur la santé. L'une des raisons est la présence de polyphénols dans énormément de produits de consommation de la vie courante, tel que les fruits, le vin, le thé et l'huile d'olive.

3.2 Résultats et discussions

3.2.1 Les polyphénols dérivés de l'huile d'olive

Notre attention s'est tout d'abord portée sur les polyphénols présents dans l'huile d'olive car plusieurs études épidémiologiques avaient démontré qu'une consommation d'huile d'olive pourrait retarder le déclin cognitif (Solfrizzi et al 2006, Solfrizzi et al 2005). Ces résultats ont été attribués aux composants antioxydants présents dans l'huile d'olive, qui permettraient de lutter contre les radicaux libres aux effets délétères : agressions des cellules, modification de l'ADN, oxydation du cholestérol. Or l'huile d'olive contient plus d'une trentaine de polyphénols (Montedoro & Petruccioli 1972) ; parmi eux nous trouvons en forte

concentration **l'oléuropeine, l'hydroxytyrosol, l'oléuropeine aglycone**. Alors que le composé majeur de l'huile d'olive est l'hydroxytyrosol (Amiot et al 1996), l'oléuropeine est le constituant principal des olives et des feuilles d'oliviers.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de ces trois composés phénoliques sur l'agrégation par diffusion de la lumière (Figure 2). Cette technique nous a permis d'observer qu'à une concentration équimolaire (protéine : molécule), l'oléuropeine, l'oléuropeine aglycone et l'hydroxytyrosol inhibé l'agrégation différemment. Le pourcentage d'inhibition de l'agrégation est de $67\pm 18\%$ pour l'oléuropeine, de $84\pm 4\%$ pour l'oléuropeine aglycone et de $51\pm 15\%$ pour l'hydroxytyrosol, alors que dans les mêmes conditions le bleu de méthylène empêche l'agrégation à $75\pm 3\%$. Grâce à ces travaux, nous avons également déterminé la valeur IC_{50} de l'oléuropeine aglycone de $1.4\mu M$, qui est deux fois meilleure que celle du bleu de méthylène ($IC_{50}=3\mu M$).

Par la suite, nous avons confirmé nos résultats grâce à la fluorescence du ThS qui permet de suivre l'élongation des filaments de la protéine Tau en se fixant au niveau des feuillettes β . L'oléuropeine aglycone montre la meilleure inhibition de la protéine Tau P301L avec une IC_{50} de $1.3\mu M$. L'hydroxytyrosol présente une IC_{50} est de $2\mu M$, alors que celle de l'oléuropeine est de $4.1\mu M$.

Deux récentes études (Li et al 2009, Monti et al 2011) ont montré à l'échelle moléculaire que l'oléocanthal est un dialdéhyde qui peut réagir avec les résidus lysines de l'héxapeptide PHF6 et du fragment K18 *in vitro*. L'interaction de l'oléocanthal avec les lysines serait le principal mode d'action pour empêcher l'agrégation. La réactivité du fragment pentanedial de l'oléocanthal vis-à-vis des fonctions amines des résidus lysines est incontestable. Nous pouvons néanmoins se poser la question de la capacité de l'oléocanthal, dans ce contexte à atteindre la protéine Tau dans les cellules neuronales.

Pour notre part, nous avons montré que l'oléuropeine aglycone dans les conditions physiologiques est essentiellement sous forme d'hémiacetal et est donc vraisemblablement incapable d'afficher la même réactivité que l'oléocanthal (Figure 55). Son activité antiagrégative est probablement liée à la présence du

fragmen 3,4-dihydroxyphenylethyloxy. Car la différence d'IC₅₀ entre l'oléuropéine aglycone et l'hydroxytyrosol n'est pas réellement significative.

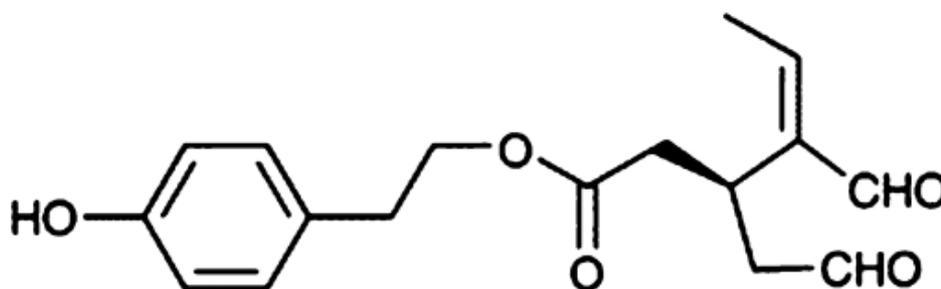


Figure 55 : Représentation de l'oléocanthal.

À la lumière des résultats rapportés ici, concernant la capacité de l'oléuropéine, l'oléuropéine aglycone et l'hydroxytyrosol à inhiber l'agrégation de la protéine Tau, nous suggérons que ces composés peuvent ainsi être liés à la réduction du risque de démences neurodégénératives liées à la MA (ou associés avec le régime méditerranéen et la consommation de EVOO). L'avantage thérapeutique lié aux polyphénols présents dans l'huile d'olive ne semble donc pas restreint aux maladies cardiovasculaires et aux cancers.

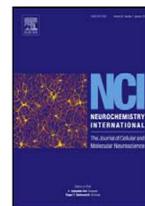
Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication et sont présentés dans l'article qui suit : Anthony Daccache, Cedric Lion, Nathalie Sibille, Melanie Gerard, Christian Slomianny, Guy Lippens, Philippe Cotelle (2011). Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry International* 58, 700-707.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuint

Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors

Anthony Daccache^{a,b,c}, Cedric Lion^{a,b}, Nathalie Sibille^{a,c}, Melanie Gerard^{d,e}, Christian Slomianny^{a,f}, Guy Lippens^{a,c,*}, Philippe Cotelle^{a,b,**}^a Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France^b USTL, EA 4478, Chimie Moléculaire et Formulation, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France^c CNRS, UMR8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France^d Laboratories of Molecular Virology and Gene Therapy, Katholieke Universiteit Leuven, B-3000 Leuven, Flanders, Belgium^e Laboratories of Biochemistry Interdisciplinary Research Centre, Katholieke Universiteit Leuven-Kortrijk, B-8500 Kortrijk, Flanders, Belgium^f Inserm U1003, Physiologie Cellulaire, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2010

Received in revised form 26 January 2011

Accepted 10 February 2011

Available online 17 February 2011

Keywords:

Hydroxytyrosol

Oleuropein

Tau

Fibrillization

Neurodegeneration

Nutrition

ABSTRACT

Tau isoforms constitute a family of microtubule-associated proteins that are mainly expressed in neurons of the central nervous system. They promote the assembly of tubulin monomers into microtubules and modulate their stability, thus playing a key structural role in the distal portion of axons. In Alzheimer's disease and related tauopathies, Tau aggregation into fibrillary tangles contributes to intraneuronal and glial lesions. We report herein the ability of three natural phenolic derivatives obtained from olives and derived food products to prevent such Tau fibrillization *in vitro*, namely hydroxytyrosol, oleuropein, and oleuropein aglycone. The latter was found to be more active than the reference Tau aggregation inhibitor methylene blue on both wild-type and P301L Tau proteins, inhibiting fibrillization at low micromolar concentrations. These findings might provide further experimental support for the beneficial nutritional properties of olives and olive oil as well as a chemical scaffold for the development of new drugs aiming at neurodegenerative tauopathies.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alois Alzheimer first described two types of lesions observed in the gray matter of a demented patient's brain in 1906 (Alzheimer, 1907). These lesions, senile plaques and neurofibrillary tangles (NFTs), are still the neuropathological defining characteristics of the disease that was named after him. Although much attention has recently been devoted to extracellular deposits of β -amyloid as the causative agent in Alzheimer's disease (AD), neurofibrillary pathology correlates better with cognitive decline in AD (Goedert and Spillantini, 2006). Tau, a microtubule-associated protein, was identified in the 1980s as the prominent component of NFTs (Grundke-Iqbal et al., 1986; Montejo de Garcini et al., 1986; Goedert et al., 1988). The observation that similar NFTs composed of Tau could be detected in other pathologies such as Pick's disease led to the term 'tauopathies'. The discovery of mutations in Tau that promote aggregation and cognitive decline (Ballatore et al.,

2007) has underscored the hypothesis that alterations in Tau might have a causative role in AD neurodegeneration (Goedert et al., 1988; Goedert and Spillantini, 2000). Finally, it was reported in the literature that Tau, when integrated in NFTs, is invariably in a hyperphosphorylated state (Lee et al., 2001).

Predominantly expressed in neurons of the central nervous system, the different Tau isoforms participate in the promotion of microtubule formation and their stabilization. Microtubules are the main structural elements of the cytoskeleton in nerve cells and are involved in axonal transport as well as in the growth and ramification of axons. Binding of Tau to the microtubule surface is mediated by its three or four microtubule-binding domains at the C-terminus of the protein. Although other posttranslational modifications (such as glycosylation, glycation, ubiquitylation, sumoylation, nitration or proteolysis) have been reported in the literature, the phosphorylation state of Tau, which is controlled by a balance of kinase and phosphatase activity, is the primary mode of regulation of its microtubule-binding affinity (for review, see Goedert and Spillantini, 2000). The longest isoform of Tau, with 441 amino acids, contains over eighty serine and threonine residues, which are all potential phosphorylation sites (Mazanetz and Fischer, 2007).

Hyperphosphorylated Tau is thought to be unable to bind to microtubules, thereby reducing their stability and leading to abnormal structural change, disruption of cellular traffic and eventually contributing to synapse dysfunction and loss (Bramblett

* Corresponding author at: CNRS, UMR8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: +33 3 20 33 72 41; fax: +33 3 20 43 65 55.

** Corresponding author at: USTL, EA 4478, Chimie Moléculaire et Formulation, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: +33 0 3 20 43 48 58; fax: +33 3 20 33 63 09.

E-mail addresses: guy.lippens@univ-lille1.fr (G. Lippens), philippe.cotelle@univ-lille1.fr (P. Cotelle).

et al., 1993). Furthermore, hyperphosphorylated Tau polymerizes into intracellular NFTs composed of bundles of paired helical filaments or straight filaments. NFTs may block axonal transport and cause cell death, and their number has been shown to be directly correlated to the degree of dementia of the patient. In this regard, the development of chemical entities able to prevent Tau aggregation and/or disassemble NFTs may prove crucial for the treatment of tauopathies.

Epidemiological studies indicate that olive oil intake may delay cognitive decline (Solfrizzi et al., 1999, 2003, 2005, 2006; Panza et al., 2004). These intriguing health benefits have been attributed to the antioxidant constituents found in olives, even though the exact molecules responsible for such health-promoting effects remain unknown. Olive oil is a source of at least thirty natural phenolic compounds (Montedoro, 1972). Among these, glycoside oleuropein **1**, hydroxytyrosol **2** (3,4-dihydroxyphenylethanol), oleuropein aglycone **3** (Scheme 1) are found in highest concentration, together with tyrosol. Whereas hydroxytyrosol is the prevalent phenolic constituent of olive oil (Amiot et al., 1996), oleuropein is the major polyphenol in the olive fruit, representing as much as 14% of the weight of the dried fruit.

In the prospect of identifying a novel chemical scaffold for the treatment of tauopathies, these considerations prompted us to assess whether these three polyphenols might contribute to the health benefits of olive oil and might also exert an inhibitory activity towards Tau aggregation.

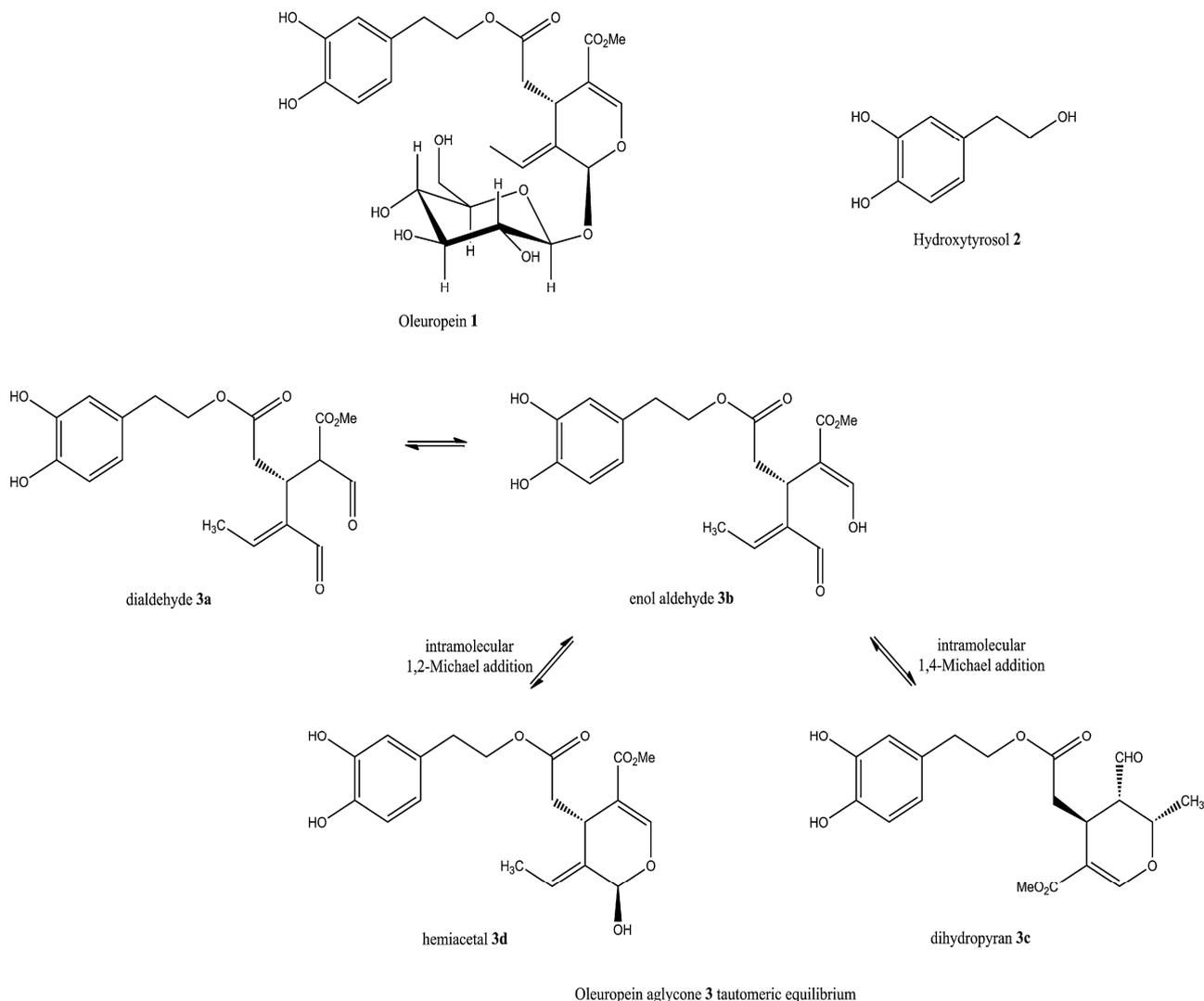
2. Materials and methods

2.1. Production and purification of olive oil compounds

Oleuropein aglycone was prepared enzymatically from commercially available oleuropein using β -glucosidase from almonds (EC 3.2.1.21; 7.80 U/mg, Sigma) according to Limirolí et al. (1995). Its purity was checked by LC-MS using a Waters XTerra C₁₈ column on a Waters Alliance 2695 HPLC system (H₂O/MeCN gradient) with a dual UV 254 nm and mass ESI+ detection on a micromass ZQ spectrometer (see supplementary data). Hydroxytyrosol was prepared synthetically by sodium borohydride reduction of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid diethyl ester as described in the literature (Bianco et al., 1988).

2.2. Expression and purification of the recombinant Tau and Tau-P301L proteins

The longest isoform of human Tau (441 amino acid residues) and Tau with the P301L mutation were expressed and purified as follow. A bacterial culture of *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen) was grown at 37 °C. It carried the longest human Tau isoform (441 aa) and Tau-P301L cloned in a pET15b plasmid under the control of a T7 promoter. When the OD at 600 nm reached a value around 0.6, Tau production was induced by adding 0.4 mM IPTG for 3 h. The culture was centrifuged and the precipitate resuspended in the extraction buffer (1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 20 mM sodium phosphate pH = 7) and a protease inhibitor cocktail was added (Complete, EDTA-free, Roche). The cell lysis was performed by sonication after addition of lysozyme and warmed up at 75 °C during 15 min. The soluble extract that contains the thermostable Tau protein was isolated by centrifugation and loaded on a cation exchange affinity column (MonoS HR5/5; GE Healthcare) equilibrated in 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 20 mM sodium phosphate pH = 7. The fractions containing the recombinant protein were pooled and buffer-exchanged to ammonium bicarbonate 50 mM (Hiprep 26/10 desalting; GE Healthcare) to be lyophilized. Concentration of recombinant Tau and Tau-P301L was determined at 280 nm with an extinction coefficient ϵ of 7700 M⁻¹ cm⁻¹. The lyophilized powder was dissolved in 25 mM sodium phosphate buffer, 25 mM NaCl, pH = 6.8.



Scheme 1. Structures of oleuropein, hydroxytyrosol and the different tautomeric forms of oleuropein aglycone.

2.3. Assembly of Tau and Tau-P301L into filaments

10 μM proteins were incubated at 37 °C for 17 h in 25 mM sodium phosphate buffer, 25 mM NaCl and 333 μM dithiothreitol (DTT) at pH 6.8 in the presence of 5 μM Heparin yielding a Heparin:Tau molar ratio of 1:2.

2.4. Light scattering assay

Proteins were incubated under fibrillization conditions (as described above) in the presence and absence of olive oil compounds for 17 h. Compounds were introduced from a DMSO stock solution, such that the final DMSO concentration was fixed to 0.7% and the same volume of DMSO was used for controls. Each sample was then assayed by light scattering at an excitation wavelength of 600 nm and an emission wavelength of 610 nm. IC_{50} values were calculated by nonlinear regression analysis using a sigmoid curve fit. The signal was measured on a PTI fluorescence spectrometer (PTI Monmouth Junction, NJ, USA) with a 2-mm quartz cell main. The excitation and emission slit widths were set at 9 nm. Experiments were repeated with at least two preparations of purified proteins for at least 3 times.

2.5. Thioflavine S fluorescence assay

After overnight incubation at 37 °C, 5 μM of Thioflavin S were added to 30 μL of the protein mixture into a well of a black μClear 384-well plate with flat transparent bottom (Greiner Bio-one, Wemmel, Belgium). The plates were sealed with transparent Ampliseal microplate sealer (Greiner Bio-one), loaded into a fluorescence plate reader (Infinite M1000, TECAN, Mechelen, Belgium). Emission spectra were then recorded at 490 nm upon excitation at 440 nm.

2.6. Electron microscopy

Aggregated samples were spun down at 100,000 g for 30 min. The resulting pellets were resuspended in 30 μL Phosphate buffer. A drop of the solution was placed on a 150 mesh Formvar coated grid for 30 s. After drying, the grid was stained with 2% aqueous uranyl acetate for 1 min. The observations were performed on a H600 transmission electron microscope (Hitachi Co.) operating at 75 kV.

2.7. NMR spectroscopy

The structure of the predominant tautomeric form of oleuropein aglycone was established from ^1H , ^1H - ^1H TOCSY and ^1H - ^1H COSY NMR data obtained from a 1 mM solution of oleuropein aglycone in D_2O buffer (25 mM phosphate 25 mM NaCl buffer, pH 6.8) on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer.

3. Results

The ability of oleuropein, oleuropein aglycone and hydroxytyrosol to inhibit the aggregation of protein Tau was evaluated on the full-length protein Tau (441 amino acid residues) and mutated P301L protein Tau (Fig. 1). This mutant, which leads to frontotemporal dementia and Parkinsonism in carriers (Hutton et al., 1998), aggregates faster than wild-type Tau (Van de broek

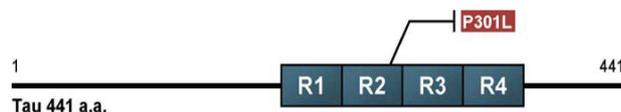


Fig. 1. Schematic diagram of the full-length human Tau protein, with the P301L mutation within the four repeat microtubule binding domain (4RMBD). The 4RMBD consists of four repeats R1–R4 and the P301L mutation is associated with frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17).

et al., 2006), and thereby facilitates an initial aggregation assay. The tested molecules were compared to methylthioninium chloride (MTC, also known as methylene blue) as a reference Tau inhibitor (Masuda et al., 2006). At a fixed concentration of 10 μM , oleuropein, oleuropein aglycone and hydroxytyrosol were found to inhibit aggregation of 10 μM P301L-Tau by $67 \pm 18\%$, $84 \pm 4\%$ and $51 \pm 15\%$, respectively. Under the same conditions, MTC prevents aggregation by $75 \pm 3\%$ (Fig. 2). Assays were conducted at variable concentrations to determine the IC_{50} of oleuropein aglycone (Fig. 3) and MTC on P301L-Tau. We thereby determined an IC_{50} value of 1.4 μM for oleuropein aglycone, which is twofold better than the value we found for MTC ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$). This latter value is in good agreement with the IC_{50} reported in the literature for MTC inhibition of wild-type Tau aggregation (Masuda et al., 2006). In order to ascertain that the oleuropein compounds had no specificity towards the P301L Tau mutant, the anti-fibrillization activity of oleuropein aglycone was also evaluated on wild-type Tau441. At a concentration of 10 μM , oleuropein aglycone also inhibits the fibrillization of wild-type Tau by $79 \pm 4\%$ (see supplementary information), discarding any hypothetical selectivity of the compound towards the P301L mutant.

Because light scattering as such cannot directly probe the amyloid character of the aggregation products, complementary assays based on Thioflavine S (ThS) fluorescence were performed (Fig. 4). As previously described for MTC (Hattori et al., 2008), there are cases of competitive binding between ThS and tested compounds over the cross- β conformation which may lead to significant variations in the results obtained. This does not appear to be the case for our molecules. Oleuropein aglycone also proved to show the best inhibition of P301L Tau aggregation with an IC_{50} of 1.3 μM determined by ThS fluorescence. This value is very well correlated with that obtained from light scattering, thus indicating that this molecule does not compete with ThS. Hydroxytyrosol presents a micromolar activity with an IC_{50} of 2.0 μM , while oleuropein exhibits a 4.1 μM IC_{50} with this technique.

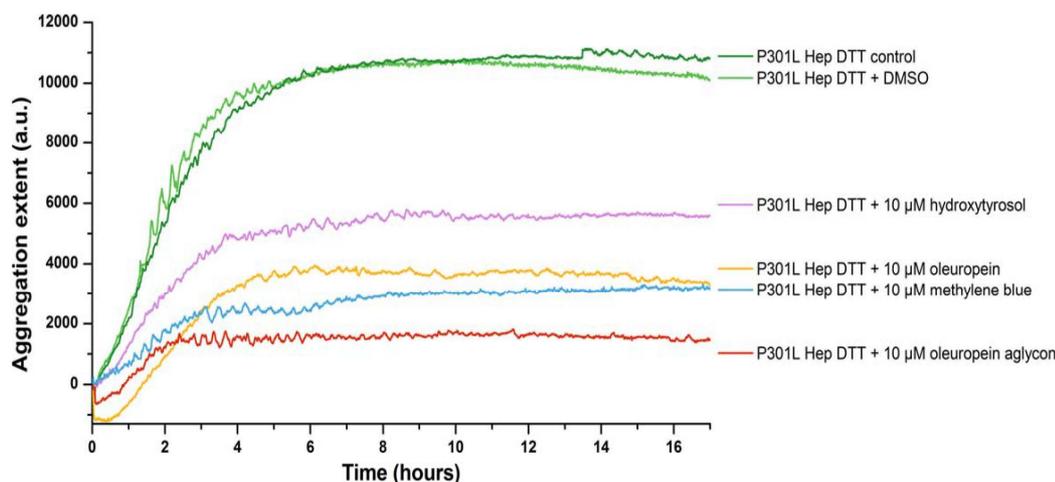


Fig. 2. Inhibition of the Tau P301L aggregation by oleuropein (yellow), oleuropein aglycone (red), hydroxytyrosol (purple) and methylene blue (blue) evaluated by light scattering assay. For Tau P301L filament assembly, 10 μM protein in 25 mM sodium phosphate buffer and 25 mM NaCl, pH 6.7 was incubated at 37 °C in the presence of 333 μM DTT and 5 μM heparin. Tested molecules in DMSO (final concentration 10 μM) were added to the P301L Tau Hep DTT mixture, and the same volume of DMSO was used for controls. Light scattering was measured at an excitation wavelength of 600 nm and an emission wavelength of 610 nm. Experiments were repeated with at least two preparations of purified proteins for at least 3 times. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

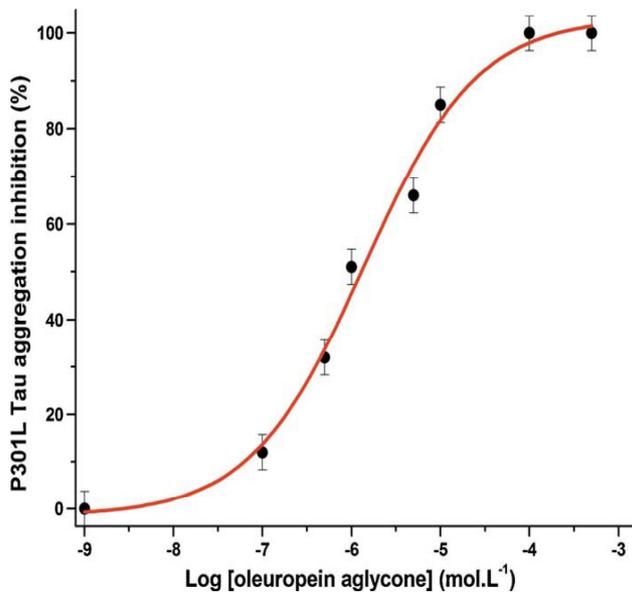


Fig. 3. Determination of the IC_{50} (inhibition of the Tau P301L aggregation) of oleuropein aglycone by light scattering. Experiments were repeated with at least two preparations of purified proteins for at least 3 times. A dose-response sigmoidal curve fit determined an IC_{50} of $1.4 \mu M$ with this technique.

Subsequently, electron microscopy was used to independently monitor the Tau-P301L fibrillization (Fig. 5). On the grids of $10 \mu M$ Tau-P301L incubated overnight with $5 \mu M$ of heparin, we found many dense areas filled with fibrillar material (Fig. 5A). Zooming in on these zones revealed the presence of mostly micrometer long fibers that moreover had the twisted appearance of PHFs (Fig. 5B). When observing the same grids of Tau-P301L assembled in the presence of $10 \mu M$ oleuropein aglycone, dense areas were significantly less frequent (Fig. 5C). When focusing again on one

of these rare zones, we found that even those contained less fibrillary material. Although some long twisted fibers could still be found in these zones, many appeared as shorter rods of 100 nanometer length (Fig. 5D). Because these latter structures absorb below the wave length of the light used to monitor the assembly process, we expect them not to contribute to the light scattering (Fig. 2). When using the other two compounds, oleuropein and hydroxytyrosol that according to the light scattering led to lesser inhibition than the oleuropein aglycone compound, we found again less dense zones than for the reference sample without compound. However, whereas in the presence of the mother compound oleuropein, fibers were similar in length and distribution as those assembled with the aglycone (Fig. 5E), fibers in the presence of hydroxytyrosol (Fig. 5F) did gain in length compared to the ones with the aglycone compound, and both twisted and straight fibers could be distinguished.

The 1H nuclear magnetic resonance spectrum of our preparation of oleuropein aglycone in deuterated aqueous buffer (25 mM sodium phosphate buffer, 25 mM NaCl, pH 6.8) shows a strong preference for this molecule to adopt the dihydropyranic form **3c** in these conditions (Fig. 6), as attested by the presence of two singlets at 9.48 and 7.57 ppm for the predominant tautomer. These signals were attributed to the aldehydic and ethylenic protons respectively, in accordance with literature data (Montedoro et al., 1993). 2D TOCSY and COSY NMR experiments allowed us to fully assign the proton signals of our 1H spectrum (see supplementary information).

4. Discussion

We report herein that the antifibrillization properties of oleuropein and its metabolic products, oleuropein aglycone and hydroxytyrosol, are comparable to that of MTC, a reference compound for Tau anti-aggregation. The concentration of hydroxytyrosol in olive oil is in the $1.4\text{--}5.6 \text{ mg/L}$ range (Montedoro et al.,

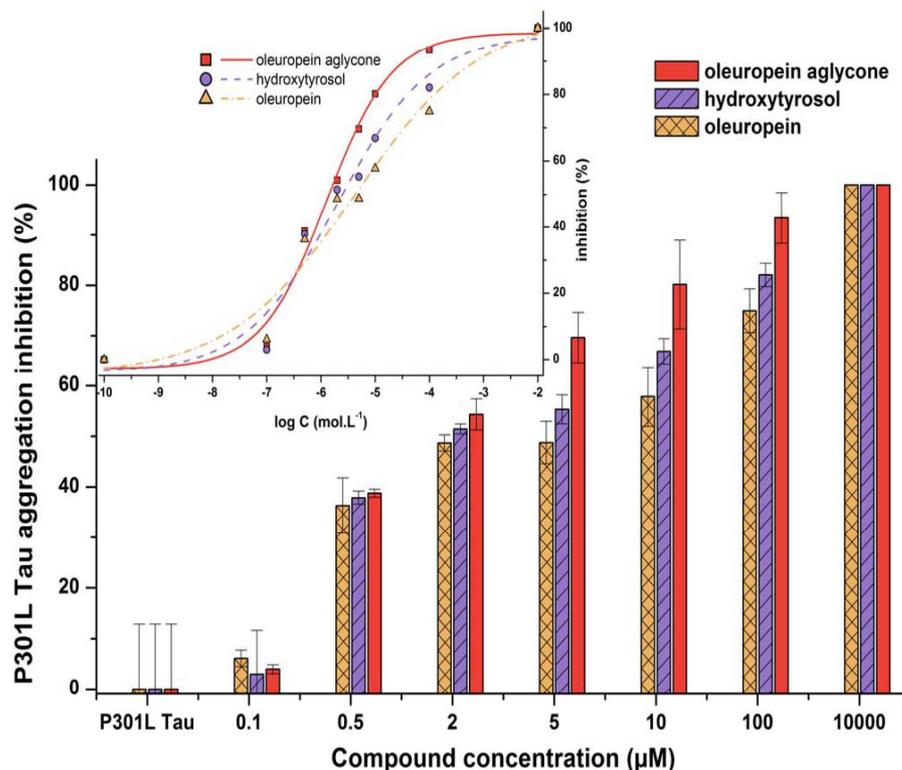


Fig. 4. ThS fluorescence based quantitation of the inhibition of Tau P301L filament formation in the absence (P301L Tau) or presence of compounds and determination of their IC_{50} s. Experiments were repeated with at least two preparations of purified proteins for at least 3 times. Dose-response sigmoidal curve fitting determined IC_{50} s of $1.3 \mu M$ for oleuropein aglycone, $2.0 \mu M$ for hydroxytyrosol and $4.1 \mu M$ for oleuropein.

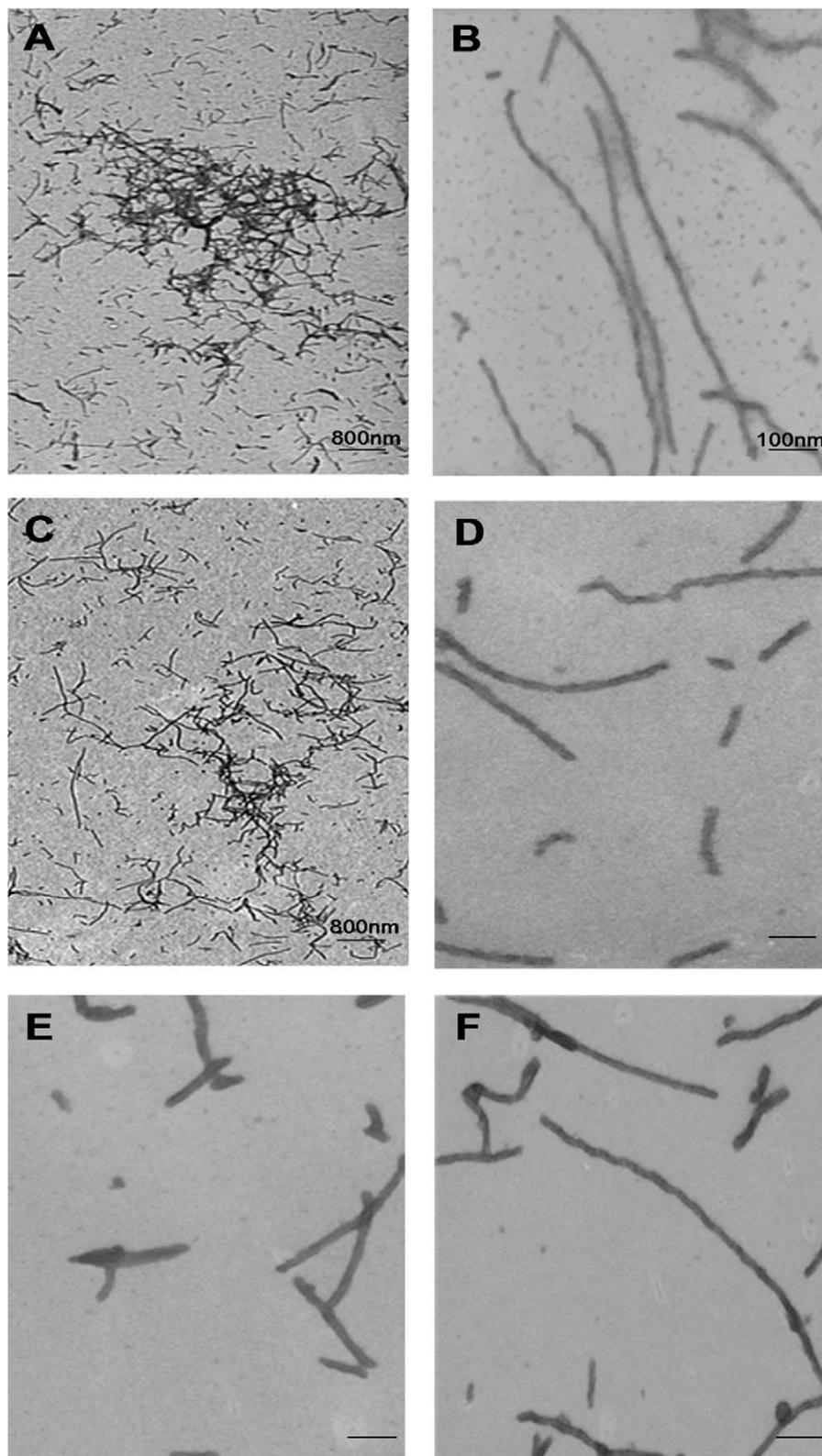


Fig. 5. Ultrastructure of negatively stained Tau-P301L filaments formed in the absence (A and B) or in the presence (10 μ M) of oleuropein aglycone (C and D), oleuropein (E) and hydroxytyrosol (F). Electron microscopy: after aggregation, the samples were spun down at 100,000 \times g for 30 min. Then the pellets were suspended in 30 μ L phosphate buffer. A drop of the solution was placed on a 150 mesh Formvar coated grid for 30 s. After drying, the grid was stained with 2% aqueous uranyl acetate for 1 min. The observations were performed on a H600 transmission electron microscope (Hitachi Co.) operating at 75 kV. The scale bar represents 800 nm for A and C pictures and 100 nm for B, D–F pictures.

1992; Coni et al., 2000). A higher concentration of 14.42 ± 3.01 mg/kg was found in extra-virgin olive oil (EVOO) (Owen et al., 2000). Oleuropein, a polyphenolic compound containing a hydroxytyrosol moiety linked to a glycosylated elenolic acid, covers the 2.3–9.0 mg/L concentration range in olive oil (Amiot et al., 1996) and is reported at 2.04 ± 0.78 mg/kg in EVOO, while the concentration of oleuropein

aglycone **3** ranges from 7.5 to 158 mg/kg (Brenes et al., 2000, 2001; Tovar et al., 2001).

The common structure in these three molecules is a 3,4-dihydroxyphenyl moiety. Equally found on other polyphenols such as NDGA, this catechol feature was previously shown to inhibit A β fibril formation (Ono et al., 2003, 2004). A recent screen of Tau

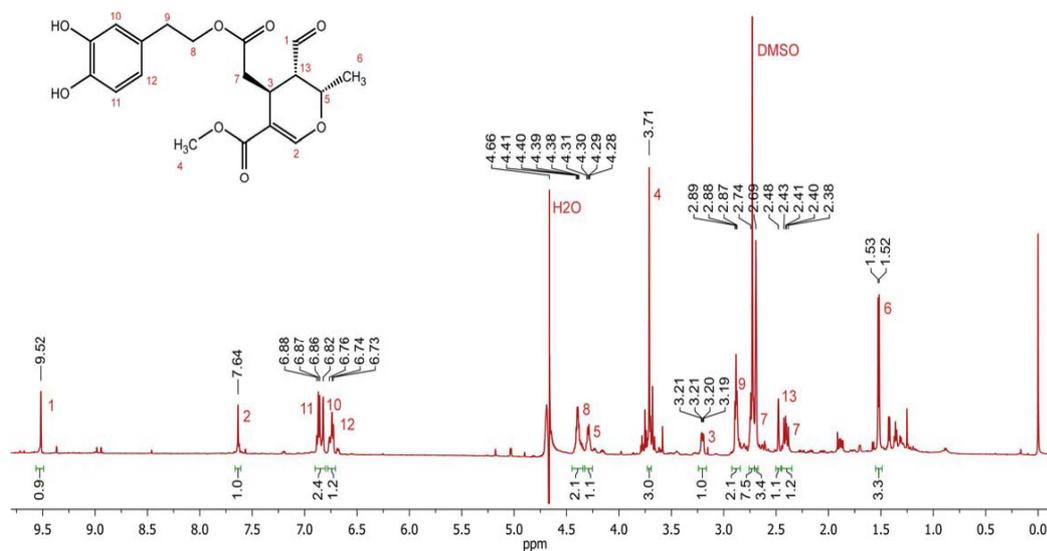


Fig. 6. Structural assignment of the predominant tautomer of oleuropein aglycone in physiological conditions via ^1H nuclear magnetic resonance. Spectra were recorded on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer. A solution of oleuropein in DMSO was dissolved in 400 μL of D_2O (25 mM sodium phosphate 25 mM NaCl buffer, pH 6.8) at a final concentration of 1 mM. Signals were fully assigned via ^1H – ^1H TOCSY NMR (see supplementary information).

aggregation inhibitors led to the discovery of gossypetin, another polyphenol with such a 3,4-dihydroxyphenyl ring (Taniguchi et al., 2005). If the role of the different molecular parts present in oleuropein, oleuropein aglycone and hydroxytyrosol is considered in the percentage of aggregation inhibition at a 10 μM compound concentration, we can conclude that the hydroxytyrosol moiety plays the dominant role in their anti-aggregation property.

Oleuropein does not appear to penetrate human Caco-2 cell monolayers or rat segments of jejunum and ileum, and is therefore very unlikely to reach neuronal cells as such. However, the absorption, distribution and elimination of its catechol metabolite hydroxytyrosol, has been extensively studied (Corona et al., 2006; Visioli et al., 2003; Bai et al., 1998; Wua et al., 2009; D'Angelo et al., 2001; Edwards and Rizk, 1980; Thiede and Kehr, 1981; Xu and Sim, 1995; Miro-Casas et al., 2003). Hydroxytyrosol is also a metabolite of dopamine, and is found at a basal concentration of 2 ng/g in the whole brain of Sprague–Dawley rats (Edwards and Rizk, 1980). Sections rich in dopaminergic innervation such as the striatum have a triple basal concentration (6 ng/g in the Wistar rat brain)(Thiede and Kehr, 1981). However, 20 min after a 100 mg/kg injection, the brain concentration of hydroxytyrosol raises a thousand fold from this basal level to an estimated 14 μM (Wua et al., 2009). The resulting brain to blood distribution ratio is 0.09, and unambiguously demonstrates that hydroxytyrosol efficiently penetrates the blood–brain barrier. In another pharmacokinetic study in rats, hydroxytyrosol was shown to be rapidly distributed to the whole body after a 1.5 mg/kg intravenous injection, with a concentration peak of 3 μM in the brain after 5 min (D'Angelo et al., 2001). In conclusion, although the basal hydroxytyrosol concentration in rat brain is in the nanomolar range (Xu and Sim, 1995), it can reach the micromolar range after exogenous administration. As for the oleuropein aglycone counterpart, although its lipophilicity is more pronounced than that of its parent compound, no data are available that prove its ability to pass biological membranes such as the blood–brain barrier.

The difference between the inhibitory properties of oleuropein and hydroxytyrosol in our *in vitro* aggregation test is marginal, and therefore suggests that neither the glucose molecule nor the heterocyclic ring of oleuropein contribute importantly to the anti-aggregation properties of oleuropein. However, oleuropein aglycone does perform consistently better than hydroxytyrosol at preventing fibrillogenesis in our aggregation assays. This molecule exists in solution as an equilibrium between a number

of keto-enolic tautomeric forms of the elenolic acid part of the molecule (see Scheme 1), involving heterocyclic ring-opening and yielding opened dialdehyde **3a**, enol aldehyde **3b**, dihydropyran **3c** and cyclic hemiacetal **3d**, depending on conditions (Gariboldi et al., 1986; Bianco et al., 1999; Impellizzeri and Lin, 2006). One of these forms shares the dialdehyde moiety that characterizes (–)-oleocanthal, another olive oil constituent which was recently shown to inhibit Tau aggregation (Li et al., 2009).

(–)-Oleocanthal isolated from freshly pressed EVOO (Andrews et al., 2003) was found to exhibit anti-inflammatory properties comparable to ibuprofen (Beauchamp et al., 2005), and was furthermore shown to abrogate fibrillization of Tau by locking the protein into the naturally unfolded state. A structure–activity relationship study based on a series of derivatives of oleocanthal pointed to an anti-fibrillization pharmacophore comprising both the saturated and unsaturated aldehyde moieties. Chemically, it has been suggested to form an adduct with the lysine of the $\text{V}_{306}\text{QIVYK}_{311}$ hexapeptide within the third repeat of Tau that would initiate the fibrillization process (Li et al., 2009). The dialdehyde moiety in oleocanthal was proposed to form a stable adduct with this lysine residue, thereby locking Tau into an unfolded conformation that prevents the transition to the β -sheet amyloid form.

However, (–)-oleocanthal exhibits an IC_{50} value of 3 μM for the fibrillization inhibition of the shorter Tau fragment K18 (P301L), which is twofold less active than the value we found for the aglycone form of oleuropein on full-length P301L-Tau. For full-length Tau as aggregating protein, 50% aggregation inhibition required 10 μM of oleocanthal. Moreover, the concentration of (–)-oleocanthal in olive oil is lower than that of oleuropein aglycone (13.0–86.4 mg/kg for oleocanthal and 7.5–157.7 mg/kg for oleuropein aglycone (Brenes et al., 2000, 2001; Tovar et al., 2001). It is noteworthy that, although they are closely related, oleocanthal and oleuropein aglycone exhibit essential structural differences. Not only the chemical properties of the catechol moiety found in the latter are different to that of the 4-hydroxyphenol group of oleocanthal, but there is also a clear reactivity contrast on the other part of the molecules. Indeed, oleocanthal is an opened dialdehyde comparable to the oleuropein aglycone form **3a**, and as such it may form stable covalent adducts with lysine residues.

The main chemical difference between oleocanthal and oleuropein aglycone is the presence of a methoxycarbonyl group

which dramatically increases the acidity of the hydrogen on the adjacent carbon. This acidity induces formation of enol aldehyde **3b**, allowing the more nucleophilic oxygen atom to react via an intramolecular 1,4-Michael addition to the remaining aldehyde moiety, thus leading to the dihydropyran form **3c** as the main isomer of oleuropein aglycone in solution.

Li et al. (2009) proposed a mechanism whereby the two aldehydic functions of oleocanthal react with the amino group of a lysine residue to give a dihydropyridinium ion (which may aromatize to a stable pyridinium ion). In the case of oleuropein aglycone only one aldehyde function may yield an aliphatic Schiff base, an easily reversible process in aqueous media. This chemical behaviour may explain the low contribution of the central enolate structure of oleuropein aglycone in preventing the aggregation of Tau, whereas the dialdehydic moiety is the main pharmacophore in oleocanthal.

5. Conclusion

The main phenolic constituents of the olive fruit or of olive oil, oleuropein, oleuropein aglycone and hydroxytyrosol, do inhibit Tau aggregation at the same level as methylene blue. Hydroxytyrosol, one of the major metabolites of oleuropein, reaches the brain after olive oil intake. Our results show that this metabolite acts as a polyphenol that inhibits the aggregation of Tau in a similar manner to other polyphenolic compounds such as gossypetin or NDGA. The presence of aldehyde moieties in the tautomeric forms of the aglycone metabolite of oleuropein increases the inhibitory capacity of this latter, through a mechanism which may differ from that of oleocanthal, another dialdehydic compound isolated from olive oil.

In light of the results reported herein regarding the ability of oleuropein, oleuropein aglycone and hydroxytyrosol to inhibit Tau aggregation, we suggest that these compounds may well be linked to the reduced risk of AD or related neurodegenerative dementias associated with the Mediterranean diet and consumption of EVOO and provide a chemical basis for the development of Tau aggregation inhibitors. Further explorations are currently underway in our laboratories regarding the structure–activity relationship of these biomolecules.

Acknowledgments

This work was financially supported by grants from the French Minister of Teaching and Research (MESR) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). PC wishes to thank Professor Tung-Hu Tsai (National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan) for helpful informations on basal hydroxytyrosol concentration in rat brain. AD wishes to thank Isabelle Landrieu and Isabelle Huvent for their support. CL thanks Nicolas Lefur for his expert technical assistance and many useful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neuint.2011.02.010.

References

- Alzheimer, A., 1907. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch Gerichtlich Medizin 64, 146–148.
- Amiot, M.J., Fleuriot, A., Macheix, J.J., 1996. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. J. Agric. Food Chem. 34, 823–826.
- Andrewes, P., Busch, J.L., De Joode, T., Groenewegen, A., Alexandre, H., 2003. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligostride aglycon as a key contributor to pungency. J. Agric. Food Chem. 51, 1415–1420.
- Bai, C., Yan, X., Takenaka, M., Sekiya, K., Nagata, T., 1998. Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by GC–MS. J. Agric. Food Chem. 46, 3998–4001.
- Ballatore, C., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Nat. Rev. Neurosci. 8, 663–672.
- Beauchamp, G., Keast, R., Morel, D., Liu, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C., Smith III, A.B., Breslin, P., 2005. Phytochemistry—ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. Nature 437, 45–46.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Garrido, A., 2000. A Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system. J. Agric. Food Chem. 48, 5178–5183.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Garrido, A., 2001. Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. J. Agric. Food Chem. 49, 5609–5614.
- Bianco, A.D., Piperno, A., Romeo, G., Uccella, N., 1999. NMR experiments of oleuropein biomimetic hydrolysis. J. Agric. Food Chem. 47, 3665–3668.
- Bianco, A., Passacantilli, G., Righi, G., 1988. Improved procedure for the reduction of esters to alcohols by sodium borohydride. Synth. Commun. 18, 1765–1771.
- Bramblett, G.T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S.E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1993. Abnormal Tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. Neuron 10, 1089–1099.
- Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Attei, R., Carlini, E.A., 2000. Protective effect of oleuropein, and olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. Lipids 35, 45–54.
- Corona, G., Tzounis, X., Dessi, M.A., Deiana, M., Debnam, E.S., Visioli, F., Spencer, J.P.E., 2006. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. Free Radical Res. 40, 647–658.
- D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., Pontoni, G., Galletti, P., Zappia, V., 2001. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. Drug Metab. Dispos. 29, 1492–1498.
- Edwards, D.J., Rizk, M., 1980. Conversion of 3,4-dihydroxyphenylalanine and deuterated 3,4-dihydroxyphenylalanine to alcoholic metabolites of catecholamines in rat brain. J. Neurochem. 36, 1641–1647.
- Gariboldi, P., Jommi, G., Verotta, L., 1986. Secoiridoids from *Olea europaea*. Phytochemistry 25, 865–869.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., 2000. Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta 1502, 110–121.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., 2006. A century of Alzheimer's disease. Science 314, 777–781.
- Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., Klug, A., 1988. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 4051–4055.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., Wisniewski, H.M., 1986. Microtubule-associated protein Tau A component of Alzheimer paired helical filaments. J. Biol. Chem. 261, 6084–6089.
- Hattori, M., Sugino, E., Minoura, K., In, Y., Sumida, M., Taniguchi, T., Tomoo, K., Ishida, T., 2008. Different inhibitory response of cyanidin and methylene blue for filament formation of Tau microtubule-binding domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 374, 158–163.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T., Heutink, P., 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in Tau with the inherited dementia FTDP-17. Nature 393, 702–705.
- Impellizzeri, J., Lin, J.M., 2006. A simple high-performance liquid chromatography method for the determination of throat-burning oleocanthal with probated anti-inflammatory activity in extra virgin olive oils. J. Agric. Food Chem. 54, 3204–3208.
- Lee, V.M., Goedert, M., Trojanowski, J.Q., 2001. Neurodegenerative tauopathies. Annu. Rev. Neurosci. 24, 1121–1159.
- Li, W., Sperry, J.B., Crowe, A., Trojanowski, J.Q., Smith, A.B., Lee, V.M., 2009. Inhibition of Tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of Tau. J. Neurochem. 110, 1339–1351.
- Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilo, V., Bianchi, G., Zetta, L., 1995. ¹H NMR study of phenolics in vegetation water of three cultivars of *Olea europaea*: similarities and differences. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1519–1523.
- Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hisanaga, S., Goedert, M., Hasegawa, M., 2006. Small Molecule Inhibitors of α -Synuclein Filament Assembly Biochemistry, vol. 45. pp. 6085–6094.
- Mazanetz, M.P., Fischer, P.M., 2007. Untangling Tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 6, 464–479.
- Miro-Casas, E., Covas, M.J., Farre, M., Fito, M., Ortuño, J., Weinbrenner, T., Roset, P., de la Torre, R., 2003. Hydroxytyrosol disposition in humans. Clin. Chem. 49, 945–952.
- Montedoro, G., 1972. Phenolic substances present in virgin olive oil Note 1. Identification of phenolic acids and their antioxidant power. Sci. Technol. Aliment. 2, 177–186.

- Montedoro, G., Servili, N., Baldioli, M., Miniati, E., 1992. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil: their extraction, separation, and quantification and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1571–1576.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchionii, A., 1993. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil 3. spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2228–2234.
- Montejo de Garcini, E., Serrano, L., Avila, J., 1986. Self assembly of microtubule associated protein Tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 790–796.
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M., 2004. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res.* 75, 742–750.
- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M., 2003. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 87, 172–181.
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalter, B., Bartsch, H., 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer* 36, 1235–1247.
- Panza, F., Solfrizzi, V., Colacicco, A.M., D'Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Del Parigi, A., Capurso, S., Capurso, A., 2004. Mediterranean diet and cognitive decline. *Public Health Nutr.* 7, 959–963.
- Solfrizzi, V., Panza, F., Torres, F., Mastroianni, F., Del Parigi, A., Venezia, A., Capurso, A., 1999. High monounsaturated fatty acids intake protects against age-related cognitive decline. *Neurology* 52, 1563–1569.
- Solfrizzi, V., Panza, F., Capurso, A., 2003. The role of diet in cognitive decline. *J. Neural. Transm.* 110, 95–110.
- Solfrizzi, V., D'Introno, A., Colacicco, A.M., Capurso, C., Del Parigi, A., Capurso, S., Gadaleta, A., Capurso, A., Panza, F., 2005. Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia. *Exp. Gerontol.* 40, 257–270.
- Solfrizzi, V., Colacicco, A.M., D'Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Rizzo, C., Capurso, A., Panza, F., 2006. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow up of the Italian longitudinal study on aging. *Neurobiol. Aging* 27, 1694–1704.
- Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., Goedert, M., Hasegawa, M., 2005. Inhibition of heparin-induced Tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J. Biol. Chem.* 280, 7614–7623.
- Thiede, H.M., Kehr, W., 1981. Catecholamine metabolism in rat brain Naunyn-Schmiedeberg's. *Arch. Pharmacol.* 318, 29–35.
- Tovar, M.J., Moltiva, M.J., Romero, M.P., 2001. Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5502–5508.
- Van de broek, T., Terwel, D., Vanhelmont, T., Gysemans, M., Van Haesendonck, C., Engelborghs, Y., Winderickx, J., Van Leuven, F., 2006. Microtubule binding and clustering of human Tau-4R and Tau-P301L proteins isolated from yeast deficient in orthologues of glycogen synthase kinase-3beta or cdk5. *J. Biol. Chem.* 281, 25388–25397.
- Visioli, F., Galli, C., Grande, S., Colonnelli, K., Patelli, C., Galli, G., Caruso, D., 2003. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J. Nutr.* 133, 2612–2615.
- Wua, Y.T., Linb, L.C., Tsai, T.H., 2009. Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1216, 3501–3507.
- Xu, C.L., Sim, M.K., 1995. Reduction of dihydroxyphenylacetic acid by a novel enzyme in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1333–1337.

3.2.2 Les polyphénols endogènes

L'hydroxytyrosol présent dans l'huile d'olive peut également être synthétisé de manière endogène à partir de la dopamine (Marchitti et al 2007). Cette dernière est un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines et donc issue de la tyrosine. Dans le système nerveux central, elle agit comme neurotransmetteur en activant les récepteurs dopaminergiques postsynaptiques. Les neurones qui en produisent ne représentent guère plus de 0,3 % des cellules du cerveau. Ces neurones sont impliqués dans le contrôle des mouvements. Quand certains de ces neurones sont détruits, on voit apparaître les tremblements caractéristiques de la maladie de Parkinson.

Les causes de cette dégénérescence neuronale sont mal connues. La mutation du gène α -synucléine et l'assemblage en fibrilles insolubles de type amyloïde serait une des hypothèses génétiques avancées. Ces agrégats vont former des inclusions neuronales de formes sphériques communément appelés corps de Lewy.

L'importante activité anti agrégative de l'hydroxytyrosol sur la protéine Tau P301L, nous a incité à tester les molécules dérivées du métabolisme de la dopamine (Figure 56) afin de déterminer leur pouvoir anti agrégeant.

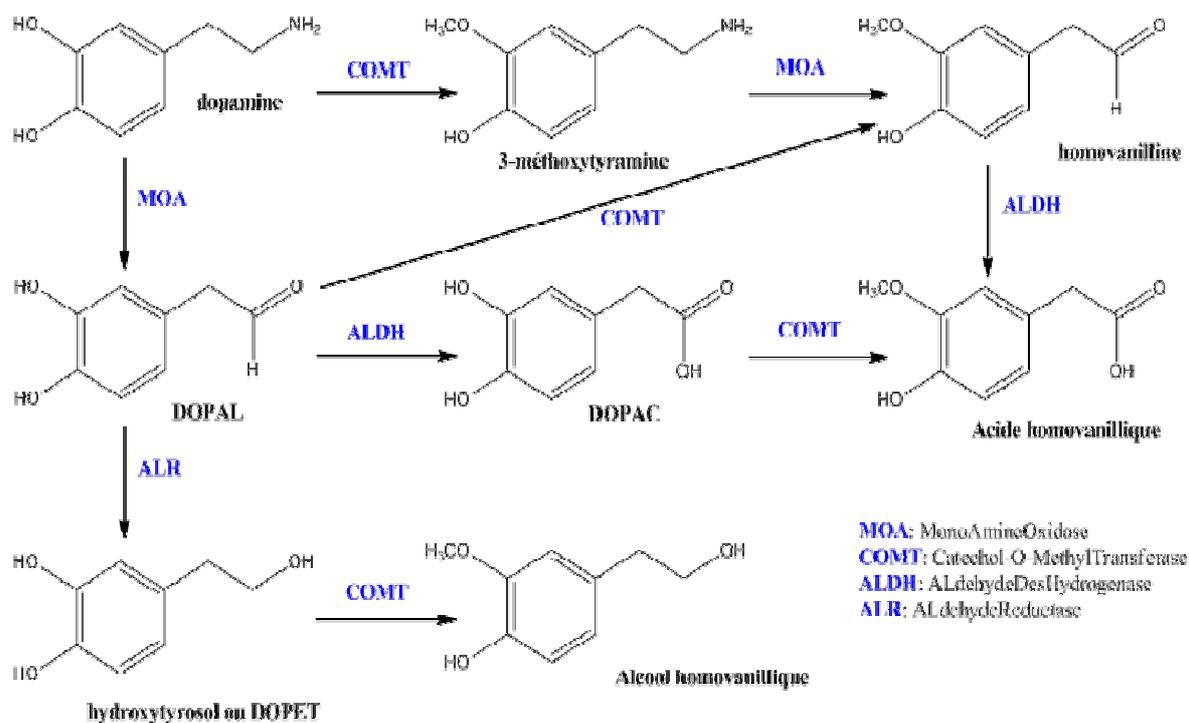


Figure 56 : Voie de métabolisation de la Dopamine. [MAO = Monoamine oxidase, COMT = catechol-O-méthyltransférase, ALR = Aldéhyde réductase, ALDH = Aldéhyde déshydrogénase, DOPET = Hydroxytyrosol].

Les résultats observés dans la Figure 57 montrent peu ou pas d'effet anti agrégatif des molécules testées, tel que le Dopac, la Dopamine et L'alcool homovanillique. Nous pouvons constater qu'à une concentration de 100 μM , le DOPAL acetal et le DOPAL inhiberait l'agrégation à 35 % et 13,5 % respectivement. Cependant le DOPAL semble présenter une IC_{50} entre 2 et 10 μM . Ces résultats devront être confirmés car nous constatons une forte variation entre les différentes concentrations.

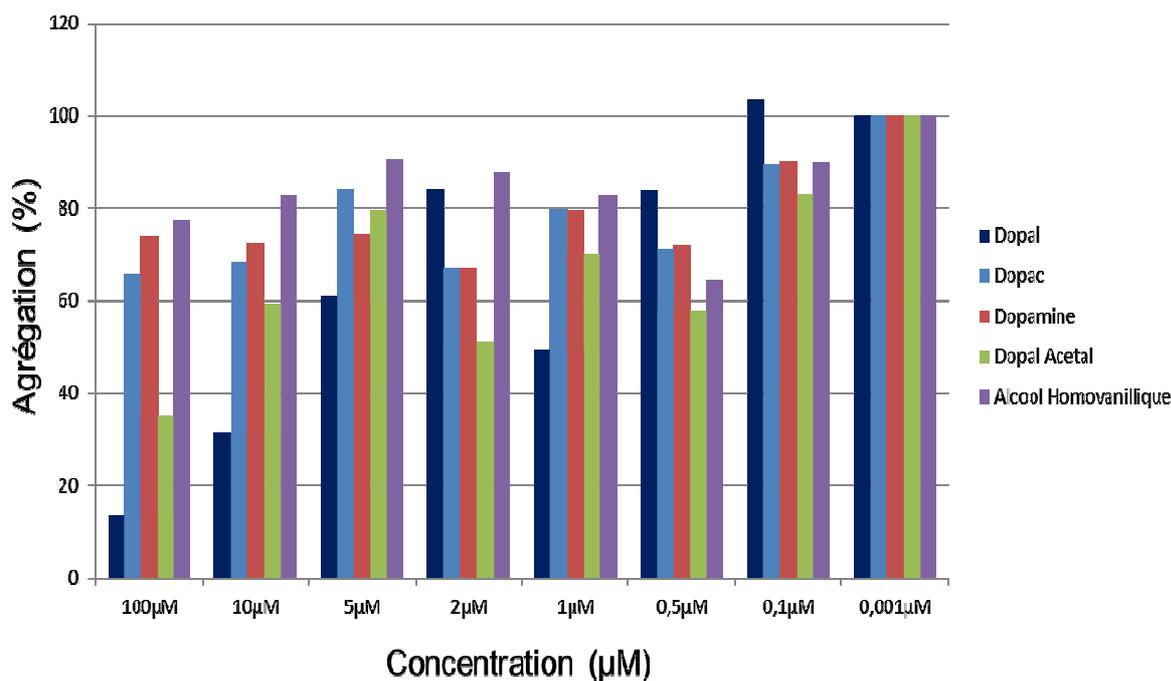


Figure 57 : Activité des molécules issues de la voie de métabolisation de la Dopamine sur l'agrégation de la protéine Tau P301L.

Au laboratoire, il a été montré que le DOPAL est instable en milieu acide et peut s'autocondenser en 6-(3,4-dihydroxyphényl)naphthalène-2,3-diol (nommé *tétrahydroxyphénylnaphthalène*) et en 5,6,14,15-tétrahydroxy-1,2,9,10-tétrahydro-1,9-époxydibenzo[a,e]cyclooctène (nommé *époxydibenzocyclooctène A*).

De plus, disposant d'un échantillon de 4,5,13,14-tétrahydroxy-1,2,9,10-tétrahydro-1,9-époxydibenzo[a,e]cyclooctène (nommé *époxydibenzocyclooctène B*) et de trois 2-phénylbenzofuranes (le 2-(3,4-dihydroxyphényl)-5-hydroxybenzofurane (nommé *benzofurane A*), le 2-(3,4-hydroxyphényl)benzofurane (nommé *benzofurane B*) et le 2-(4-hydroxyphényl)benzofurane (nommé *benzofurane C*), de structure comparable aux produits d'autocondensation du DOPAL, nous avons testé ces six molécules sur l'agrégation de la protéine Tau P301L (Figure 58).

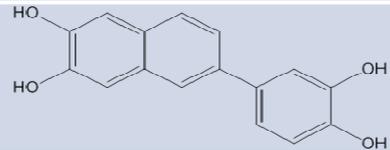
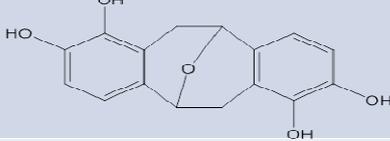
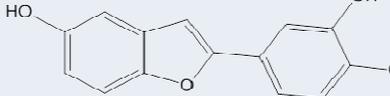
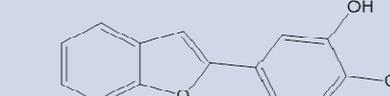
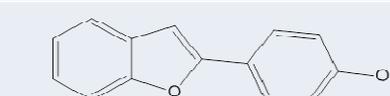
NOM	Structure	IC ₅₀ (μ M)
Tetrahydroxyphénylnaphtalène		0,8
Epoxydibenzocyclooctène A		3,4
Epoxydibenzocyclooctène B		1,12
Benzofurane A		1,75
Benzofurane B		1,8
Benzofurane C		9,6

Figure 58 : Représentation des molécules anti agrégatives.

Le tétrahydroxyphénylnaphtalène présente la meilleure activité anti agrégative sur la protéine Tau P301L avec une IC₅₀ de 0.8 μ M (Figure 59A). Deux autres molécules se distinguent par une forte action anti agrégative l'époxydibenzocyclooctène B et le benzofurane A dont l'IC₅₀ est de 1.12 μ M et 1.75 μ M respectivement. Enfin, l'IC₅₀ de l'époxydibenzocyclooctène A est de 3.4 μ M. De plus, nous avons constaté que la suppression d'un groupement hydroxy (benzofurane B) ne provoquait pas un changement significatif de l'activité antiagrégante (IC₅₀ = 1.8 μ M) alors qu'une modification au niveau du groupement catéchol réduit la capacité anti agrégative du benzofurane C (IC₅₀ 9.6 μ M) (Figure 59B).

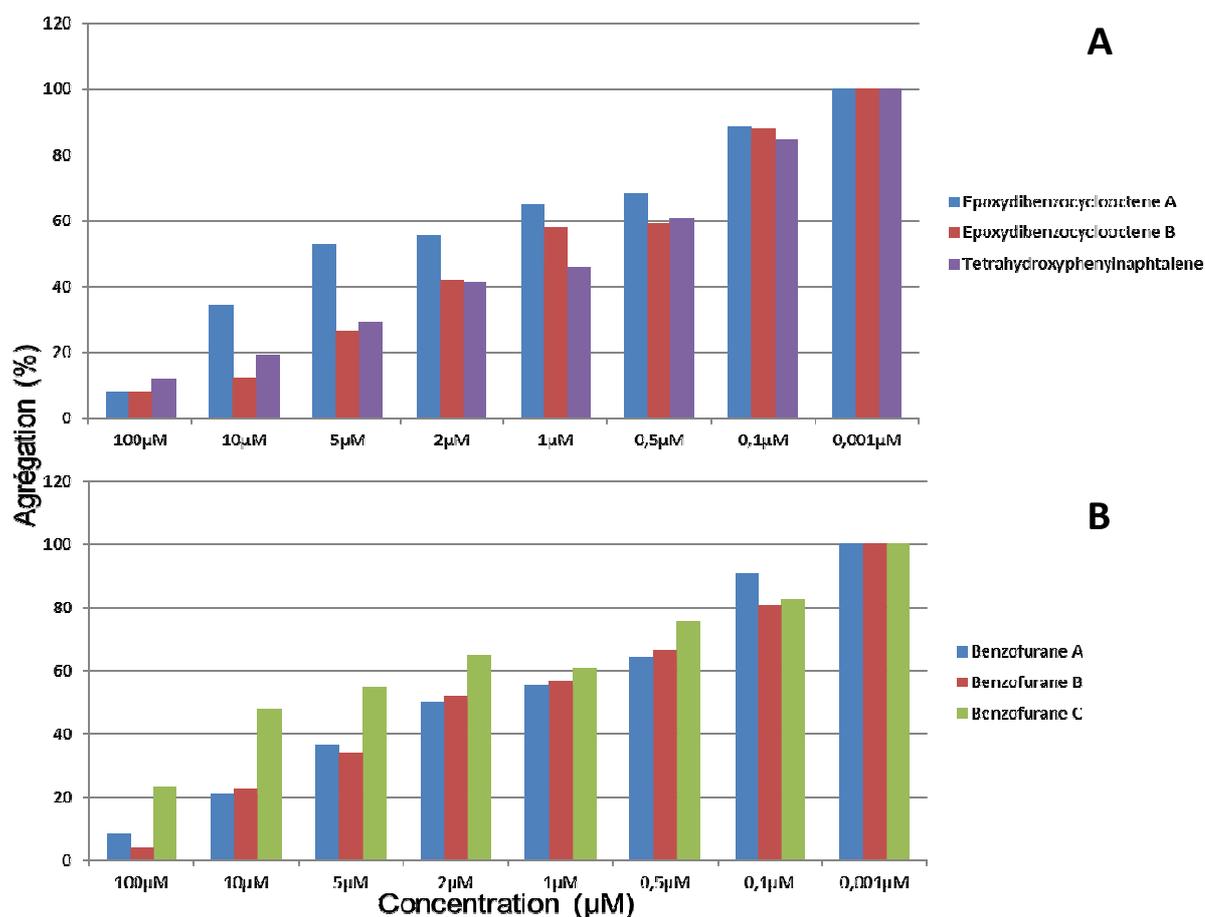


Figure 59 : Activité des molécules issues de l'autocondensation du DOPAL et de structure semblable à ceux issues de l'autocondensation, sur l'agrégation de la protéine Tau P301L.

Si la présence des produits d'autocondensation du DOPAL en milieu biologique (cerveau, sang, urine) n'est pas connue à ce jour, la présence du DOPAL ainsi que le produit issu de la réaction de Pictet-Spengler du DOPAL avec la dopamine est bien documentée.

Les concentrations basales du DOPAL ont été reportées pour divers fluides biologiques humains. Dans la substance noire du cerveau de patients males de 70 ans, elle est de ~350-400 pg/mg (Burke et al 1999, Li et al 2001). Les concentrations du DOPAL dans l'urine et le plasma d'hommes en bonne santé sont de 10 nM et 64 nM respectivement (Burke et al 1999). La formation exogène de DOPAL a été démontrée pour la première fois en 1973 via la détection de tétrahydropapavéroline dans l'urine de patients parkinsoniens traités avec la L-dopa (Sandler et al 1973). Mais la formation de S-tétrahydropapavéroline a aussi

été identifiée. C'est le premier intermédiaire de la biosynthèse de la morphine endogène dans les neuroblastomes humains (Boettcher et al 2005).

A partir de DOPAL endogène ou exogène, il n'est néanmoins pas impossible que le tétrahydronaphtalène et l'époxydibenzocyclooctène A puissent exister *in vivo* mais cela reste à prouver. Les activités anti agrégantes de ces deux molécules sont suffisamment remarquables pour que l'on s'attache à contrôler leurs présences/absences dans des fluides biologiques humains.

La sélection des trois benzofuranes vient de leur structure 2-phénylbenzofuranique que nous pouvons retrouver dans de nombreuses polyphénols naturels stilbéniques comme la moracine M, le picéatannol ou encore le resvératrol ou des structures plus complexes comme la ϵ -viniferine glucoside (Figure 60). Ces deux derniers composés se sont révélés être de très bons inhibiteurs de l'agrégation des peptides β -amyloïdes (Riviere et al 2010) ; (Richard et al 2011).

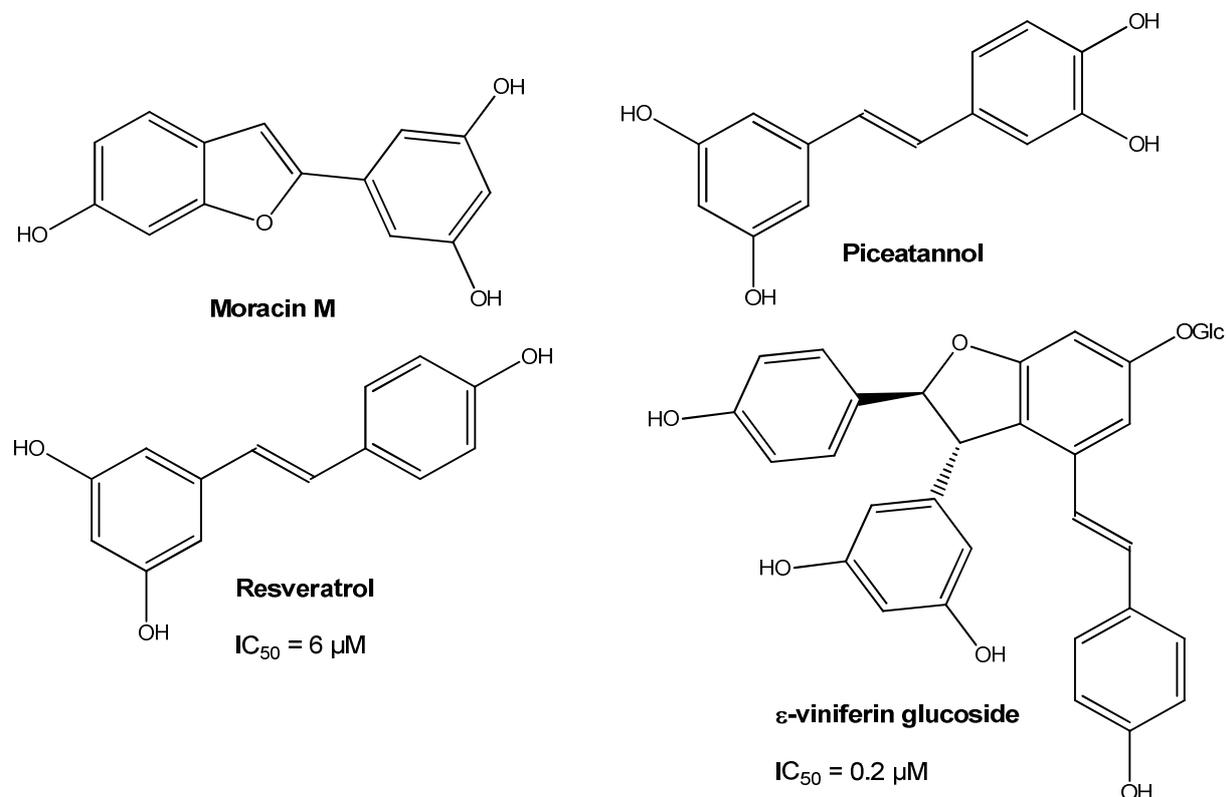


Figure 60 : Structure de molécules comparable aux benzofuranes.

Excepté l'hydroxytyrosol, les molécules dérivées de la voie de métabolisation du DOPAL ne semblent pas entraîner une inhibition de l'agrégation à faible concentration. La différence d'agrégation observée entre ces molécules ne s'avère pas être provoquée par les modifications chimiques du noyau catéchol comme nous avons pu le croire, mais plutôt de la chaîne latérale hydroxyéthyle.

Tandis que, les résultats obtenus avec les dimères du DOPAL et les benzofuranes ont montré une forte activité anti agrégante et l'importance du groupement catechol.

Ces résultats restent à être confirmés *in cellulo* et *in vivo* pour contrôler la toxicité des molécules.

3.2.3 Les polyphénols dérivés du romarin

Le romarin est un arbrisseau de la famille des Lamiacées, poussant à l'état sauvage sur le pourtour méditerranéen. Cette plante fait l'objet de très nombreuses mentions historiques et légendaires.

Selon une légende, le romarin était à l'origine une plante à fleurs blanches. Avant de donner naissance à l'enfant Jésus, Marie, aurait déposé sa cape de couleur bleue sur un romarin planté devant l'étable. La cape aurait déteint sur l'arbrisseau et c'est ainsi que, depuis, tous les romarins fleurissent bleus. Certains voient dans cette légende une autre origine possible au nom Romarin à savoir "Rose de Marie" (l'appellation anglaise étant d'ailleurs Rosemary). L'Histoire voudrait que les égyptiens plaçaient des rameaux de romarin dans la tombe des pharaons afin de fortifier leur âme. De plus, le romarin était très populaire durant les épidémies de peste : les rameaux étaient brûlés pour purifier l'air.

Le romarin est une source naturelle et importante d'acide rosmarinique. Des expériences *in vitro* et *in vivo* (murin) indiquent que l'activité antioxydante de l'acide rosmarinique pourrait inhiber la prolifération des cellules cancéreuses (Fahim et al 1999). Les chercheurs attribuent les effets antiproliférateur (Visanji

et al 2006) et antimutagène (Del Bano et al 2006) du romarin aux composés polyphénoliques qu'il renferme.

Des études *in vitro* réalisées par Masuda et coll. (Masuda et al 2006) ont montré un effet anti agrégatif de l'acide rosmarinique sur les protéines A β , α -synucléine et Tau, avec des IC₅₀ respectivement de 12 μ M, 4.8 μ M, 16.6 μ M. Ces résultats suggèrent que l'acide rosmarinique pourrait aider à lutter contre les maladies neurodégénératives caractérisées par la formation de filaments fibrillaires.

Nous avons testés l'acide rosmarinique et deux dérivés nitrés précédemment synthétisés au laboratoire dans le but de mimer la nitration qui pourrait avoir lieu dans la salive et l'estomac (Figure 61) (Dubois et al 2008).

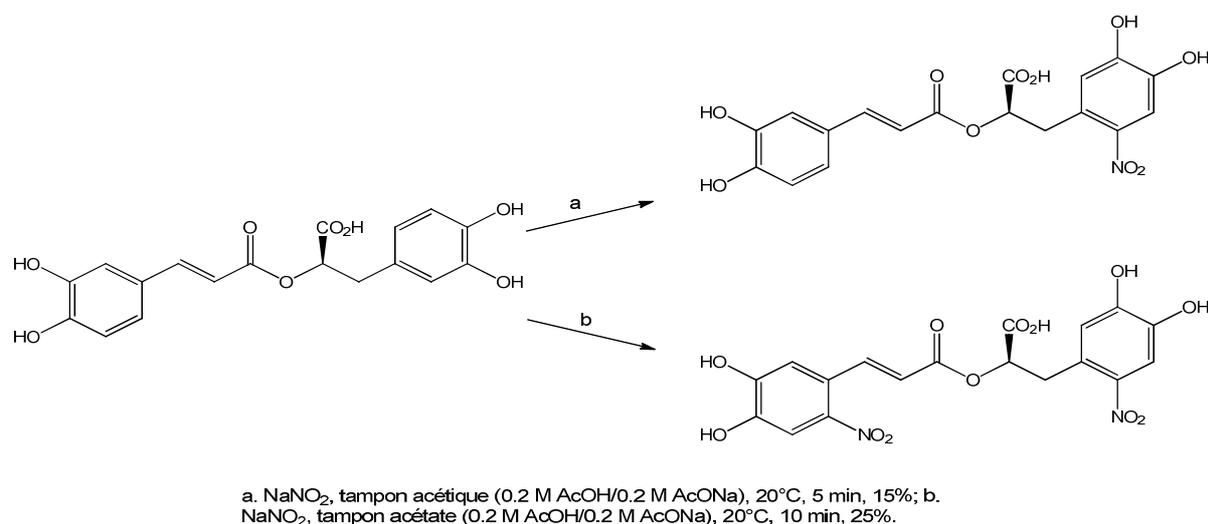


Figure 61 : Structure de l'acide rosmarinique, de l'acide mononitré et dinitré.

Ces trois composés ne montrent pas d'effet notable sur l'agrégation de Tau P301L, que ça soit par diffusion de la lumière (Figure 62) ou par fluorescence du ThS (Figure 63).

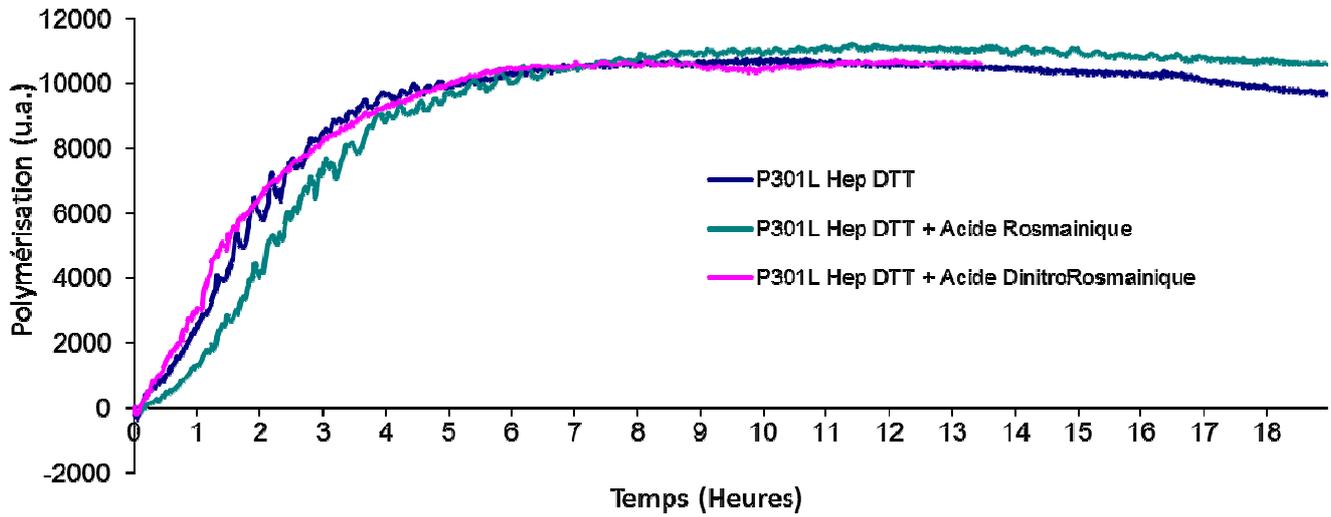


Figure 62 : Courbes d'agrégation de la protéine Tau P301L en présence d'Acide Rosmarinique et d'Acide DinitroRosmarinique, suivies par diffusion de la lumière.

L'inhibition de l'agrégation n'est presque pas du tout affectée par ces modifications comme nous pouvons le voir sur les histogrammes suivants.

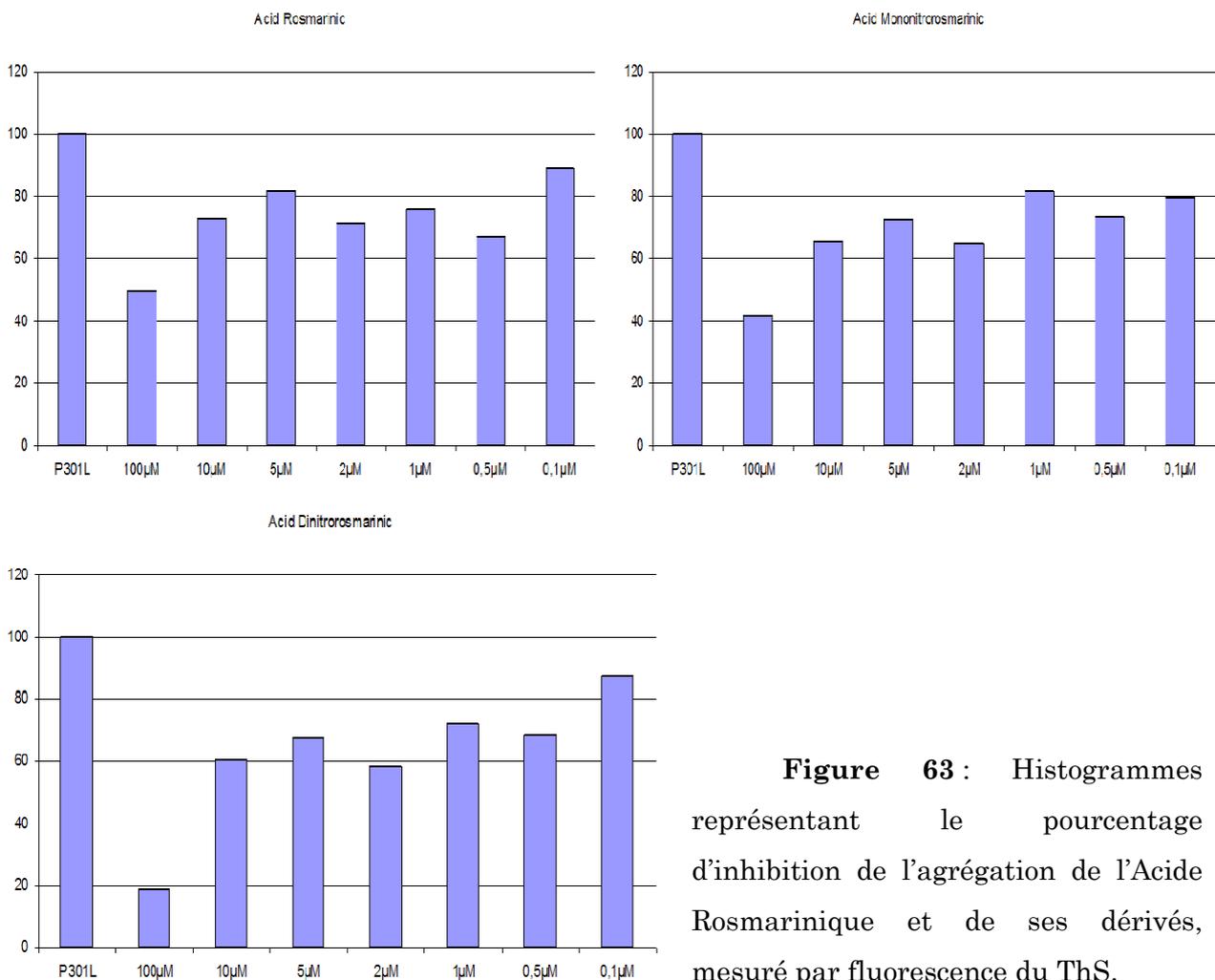


Figure 63 : Histogrammes représentant le pourcentage d'inhibition de l'agrégation de l'Acide Rosmarinique et de ses dérivés, mesuré par fluorescence du ThS.

L'agrégation est inhibée d'environ 50% en présence de 100µM d'acide rosmarinique et d'acide mononitrorosmarinique, alors que l'acide dinitrorosmarinique empêcherait l'agrégation d'environ 80% à une concentration de 100µM.

Ces résultats montrent qu'une faible concentration de polyphénols rosmarinique semble être inefficace face à l'agrégation de Tau *in vitro*.

3.3 Conclusion

Les polyphénols sont présents dans plusieurs fruits et légumes. Ils sont responsables de l'astringence de certains aliments en précipitant certaines protéines (Hagerman & Butler 1981). La communauté scientifique leur confère également des propriétés médicinales chez l'homme. En effet, leurs multiples groupements phénoliques auraient des effets antioxydant, anticancérigène, antibactérien (Chen et al 2004) ; (Frankel et al 1993)...

Les polyphénols ont une affinité significative pour les protéines et les peptides qui contiennent une forte concentration de résidus proline dans leurs séquences (Hagerman & Butler, 1981). Les trois acides aminés les plus représentés au sein de ces protéines, proline, glutamine et glycine, permettent à la protéine d'adopter une structure ouverte qui facilite l'approche des polyphénols (Sarni-Manchado et al 1999).

Les principaux mécanismes d'interaction entre les polyphénols et les protéines sont au nombre de trois, représentés sur la figure 64 : les interactions hydrophobes (forces attractives de Van der Waals), les liaisons hydrogène et enfin les interactions de type ioniques absentes au pH utilisé, acide.

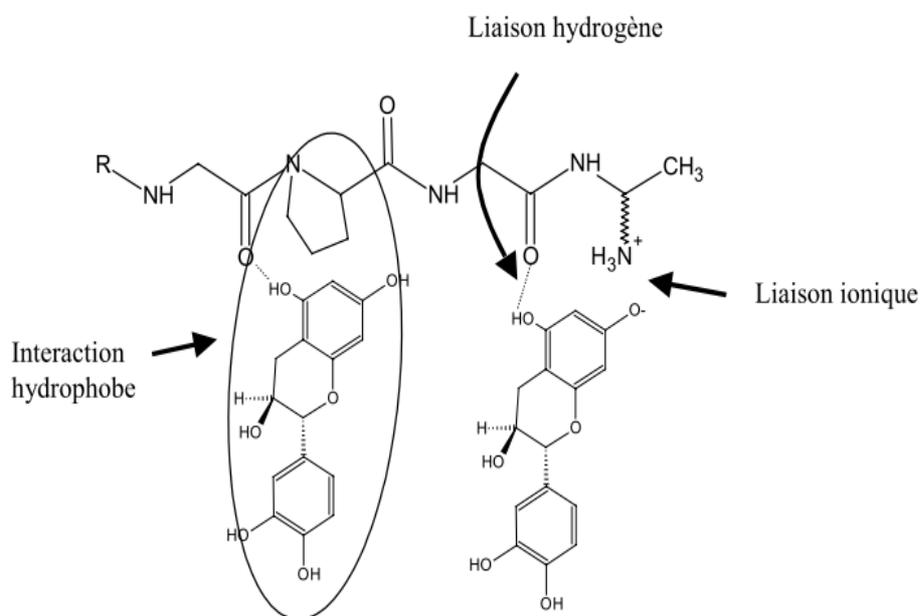


Figure 64 : Interaction des protéines avec les polyphénols.

La liaison majeure polyphénols-protéines commence par une interaction hydrophobe entre les résidus prolines et le noyau aromatique des phénols, puis par la formation d'agrégats de petites tailles et enfin par une précipitation des protéines (Poncet-Legrand et al 2007). Ce mécanisme est responsable, par exemple, de la sensation d'astringence ressentie lorsque nous buvons du vin (Baxter et al 1997). La présence de prolines dans la séquence peptidique est nécessaire car, d'un côté, elle induit le caractère hydrophobe du squelette carboné et, de l'autre, la fonction carbonyle des prolines des PRPs, liée à un amide tertiaire, est reconnue comme plus accepteur de liaisons hydrogène que les autres résidus possédant un amide secondaire (Luck et al 1994). Ces liaisons hydrogène seraient assurées par les fonctions hydroxyle des polyphénols (Haslam 1974). Le cycle pyrrolidine de la proline offre un site ouvert et rigide d'interaction avec la partie aromatique du phénol (Murray et al 1994). Le troisième type d'interaction,

ionique, est probablement moins important mais peut s'ajouter à l'ensemble des interactions précédentes.

Toutes ces données nous poussent à croire que l'interaction entre nos polyphénols et la protéine Tau P301L s'effectue de la même manière que précédemment car la séquence peptidique de Tau possède 9,8% de prolines, 11,1% de Glycines et 4,3% de Glutamines. La différence d'inhibition de l'agrégation entre les différents polyphénols serait due à la position des groupements OH, car leurs proximités sur le composé phénolique favoriseraient la solidité de la liaison formée (Siebert 1999). Et ceci est plutôt flagrant lorsque nous comparons l'IC₅₀ des benzofuranes B et C.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

La maladie d'Alzheimer est à la fois une maladie dévastatrice et coûteuse, et avec l'évolution démographique, en particulier celle de la population âgée, elle est devenue l'une des principales préoccupations de santé publique.

Les lésions intracellulaires qui définissent la MA et les tauopathies sont corrélées avec une perte neuronale et un déclin cognitif, faisant d'eux les marqueurs de ces maladies. Après avoir découvert la toxicité des agrégats de Tau, la compréhension du processus d'agrégation de Tau a pris de l'importance. Les résultats présentés ici nous ont permis de clarifier quelques points concernant la polymérisation de Tau et de découvrir des molécules avec un fort potentiel anti agrégatif.

Dans un premier temps, nous avons démontré que les meilleures conditions pour obtenir une bonne agrégation *in vitro* de la protéine Tau semble être : un pH entre 6 et 7, une température à 37°C, un milieu réducteur (0,3 mM DTT), mais également de l'héparine pour faciliter l'interaction entre deux protéines Tau chargées positivement. Ces conditions expérimentales *in vitro* peuvent ressembler aux conditions retrouvées *in vivo*.

De plus, nous avons créé un mutant unique de Tau entier qui comprend la mutation P301L mais qui ne présente pas de cystéines en 291 et 322. A l'aide de ce mutant, nous avons constaté que l'agrégation pouvait avoir lieu en l'absence de ponts disulfures intermoléculaires, ce qui signifie qu'il existe un mécanisme d'interaction entre les protéines qui ne nécessitent pas la première étape de dimérisation. Ce résultat a été confirmé à l'aide du fragment Tau F4 2CS et de ses mutants, qui nous ont également permis de découvrir l'importance de la région riche en proline de la protéine Tau dans le processus d'agrégation.

L'utilisation de P301L2CS et TauF4 2CS nous permettra dans l'avenir de comprendre et de suivre étape par étape le processus d'agrégation afin de déterminer l'origine de l'agrégation.

Par la suite, nous avons testé plusieurs nouvelles molécules de polyphénols pouvant empêcher l'agrégation des protéines Tau et nous avons constaté que les molécules dérivées de l'huile d'olive et celles résultant de la dimérisation du

DOPAL, entraînent une forte inhibition de l'agrégation à très faible concentration. Des expériences devront être effectuées afin de vérifier si ces mêmes molécules peuvent provoquer la désagrégation de filaments de Tau préformés. De plus, des tests *in cellulo* et *in vivo* devront être réalisés afin de vérifier la toxicité de ces molécules. Mais le plus intéressant sera de vérifier si ces molécules empêchent l'élongation des agrégats fibrillaires en se fixant au niveau des prolines comme nous l'avons décrit précédemment.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW, et al. 2000. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *Journal of cell science* 113 Pt 21: 3737-45
- Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T. 2007. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta(25-35). *Behavioural brain research* 180: 139-45
- Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 1996. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nature medicine* 2: 783-7
- Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 1994. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5562-6
- Alonso AD, Di Clerico J, Li B, Corbo CP, Alaniz ME, et al. 2010. Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *The Journal of biological chemistry* 285: 30851-60
- Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. 1996. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 34: 823-26
- Amos LA. 2004. Microtubule structure and its stabilisation. *Organic & biomolecular chemistry* 2: 2153-60
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. 1992. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31: 10626-33
- Andrews P, BJLCH, Joode T. D., Groenewegen A. & Alexandre H. 2003. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside agglycon as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1415-20
- Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, Hart GW. 1996. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *The Journal of biological chemistry* 271: 28741-4
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. 2002. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 103: 26-35
- Barghorn S, Mandelkow E. 2002. Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 41: 14885-96
- Barghorn S, Zheng-Fischhofer Q, Ackmann M, Biernat J, von Bergen M, et al. 2000. Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry* 39: 11714-21
- Baxter NJ, Lilley TH, Haslam E, Williamson MP. 1997. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* 36: 5566-77
- Bednarski E, Lynch G. 1996. Cytosolic proteolysis of tau by cathepsin D in hippocampus following suppression of cathepsins B and L. *Journal of neurochemistry* 67: 1846-55
- Bendiske J, Bahr BA. 2003. Lysosomal activation is a compensatory response against protein accumulation and associated synaptopathogenesis--an approach for slowing Alzheimer disease? *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62: 451-63
- Bhattacharya K, Rank KB, Evans DB, Sharma SK. 2001. Role of cysteine-291 and cysteine-322 in the polymerization of human tau into Alzheimer-like filaments. *Biochemical and biophysical research communications* 285: 20-6
- Bianco A, Passacantilli, G., Righi, G. 1988. Improved procedure for the reduction of esters to alcohols by sodium borohydride. *Synth. Commun.* 18: 1765-71

- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 51: 971-4
- Boettcher C, Fellermeier M, Drager B, Zenk MH. 2005. How human neuroblastoma cells make morphine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8495-500
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82: 239-59
- Brandt R, Hundelt M, Shahani N. 2005. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochimica et biophysica acta* 1739: 331-54
- Brandt R, Leger J, Lee G. 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131: 1327-40
- Brenes M, Garcia A, Garcia P, Garrido A. 2000. Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system. *Journal of agricultural and food chemistry* 48: 5178-83
- Brenes M, HFJ, Garcia A., Rios J. J., Garcia P., Zamora R. & Garrido A. 2000. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of American oil Chemist's Society*. 77: 715-20
- Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *Journal of submicroscopic cytology* 17: 89-96
- Brown MR, Bondada V, Keller JN, Thorpe J, Geddes JW. 2005. Proteasome or calpain inhibition does not alter cellular tau levels in neuroblastoma cells or primary neurons. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 7: 15-24
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain research. Brain research reviews* 33: 95-130
- Buee L, Delacourte A. 2006. [Tauopathy and Alzheimer disease: a full degenerating process]. *Psychologie & neuropsychiatrie du vieillissement* 4: 261-73
- Bulic B, Pickhardt M, Khlistunova I, Biernat J, Mandelkow EM, et al. 2007. Rhodanine-based tau aggregation inhibitors in cell models of tauopathy. *Angew Chem Int Ed Engl* 46: 9215-9
- Burke WJ, Chung HD, Li SW. 1999. Quantitation of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3, 4-dihydroxyphenylglycolaldehyde, the monoamine oxidase metabolites of dopamine and noradrenaline, in human tissues by microcolumn high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* 273: 111-6
- Butler D, Bahr BA. 2006. Oxidative stress and lysosomes: CNS-related consequences and implications for lysosomal enhancement strategies and induction of autophagy. *Antioxidants & redox signaling* 8: 185-96
- Butler D, Nixon RA, Bahr BA. 2006. Potential compensatory responses through autophagic/lysosomal pathways in neurodegenerative diseases. *Autophagy* 2: 234-7
- Butner KA, Kirschner MW. 1991. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *The Journal of cell biology* 115: 717-30
- Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA. 2003. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *Journal of neurochemistry* 85: 1394-401
- Chen D, Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A, Bhuiyan M, et al. 2004. Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9: 2618-31
- Chin JY, Knowles RB, Schneider A, Drewes G, Mandelkow EM, Hyman BT. 2000. Microtubule-affinity regulating kinase (MARK) is tightly associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer brain: a fluorescence resonance energy transfer study. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 59: 966-71
- Chirita C, Necula M, Kuret J. 2004. Ligand-dependent inhibition and reversal of tau filament formation. *Biochemistry* 43: 2879-87

- Choi HR, Choi JS, Han YN, Bae SJ, Chung HY. 2002. Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytotherapy research : PTR* 16: 364-7
- Churcher I. 2006. Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Current topics in medicinal chemistry* 6: 579-95
- Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RS. 2009. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical reviews in food science and nutrition* 49: 218-36
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, et al. 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature cell biology* 11: 909-13
- Congdon EE, Kim S, Bonchak J, Songrug T, Matzavinos A, Kuret J. 2008. Nucleation-dependent tau filament formation: the importance of dimerization and an estimation of elementary rate constants. *The Journal of biological chemistry* 283: 13806-16
- Congdon EE, Neclula M, Blackstone RD, Kuret J. 2007. Potency of a tau fibrillization inhibitor is influenced by its aggregation state. *Archives of biochemistry and biophysics* 465: 127-35
- Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, et al. 2000. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* 35: 45-54
- Conte A, Pellegrini S, Tagliazucchi D. 2003a. Effect of resveratrol and catechin on PC12 tyrosine kinase activities and their synergistic protection from beta-amyloid toxicity. *Drugs under experimental and clinical research* 29: 243-55
- Conte A, Pellegrini S, Tagliazucchi D. 2003b. Synergistic protection of PC12 cells from beta-amyloid toxicity by resveratrol and catechin. *Brain research bulletin* 62: 29-38
- Crowe A, Ballatore C, Hyde E, Trojanowski JQ, Lee VM. 2007. High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. *Biochemical and biophysical research communications* 358: 1-6
- Cuchillo-Ibanez I, Seereeram A, Byers HL, Leung KY, Ward MA, et al. 2008. Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *FASEB J* 22: 3186-95
- D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, et al. 2001. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 29: 1492-8
- D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, et al. 1999. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5598-603
- David DC, Layfield R, Serpell L, Narain Y, Goedert M, Spillantini MG. 2002. Proteasomal degradation of tau protein. *Journal of neurochemistry* 83: 176-85
- de Calignon A, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, et al. 2010. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464: 1201-4
- Del Bano MJ, Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, Martin-Gil R, et al. 2006. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 2064-8
- Delacourte A, Buee L. 2000. Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. *Current opinion in neurology* 13: 371-6
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, et al. 1999. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52: 1158-65
- Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N, Buee L, Hof PR, et al. 1996. Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55: 159-68
- Derkinderen P, Scales TM, Hanger DP, Leung KY, Byers HL, et al. 2005. Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. *J Neurosci* 25: 6584-93

- Deshpande A, Win KM, Busciglio J. 2008. Tau isoform expression and regulation in human cortical neurons. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22: 2357-67
- DeTure MA, Di Noto L, Purich DL. 2002. In vitro assembly of Alzheimer-like filaments. How a small cluster of charged residues in Tau and MAP2 controls filament morphology. *The Journal of biological chemistry* 277: 34755-9
- Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL. 2008. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319: 1086-9
- Dragsted LO. 2003. Antioxidant actions of polyphenols in humans. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* 73: 112-9
- Drewes G, Ebnet A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1997. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89: 297-308
- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, et al. 1995. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *The Journal of biological chemistry* 270: 7679-88
- Drubin DG, Feinstein SC, Shooter EM, Kirschner MW. 1985. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *The Journal of cell biology* 101: 1799-807
- Dubey M, Chaudhury P, Kabiru H, Shea TB. 2008. Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability. *Cell motility and the cytoskeleton* 65: 89-99
- Dubois M, Bailly F, Mbemba G, Mouscadet JF, Debyser Z, et al. 2008. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. *Journal of medicinal chemistry* 51: 2575-9
- Dupont R, Cotelle P. 2001. Facile Access to Methoxylated 2-Phenylnaphthalenes and Epoxydibenzocyclooctenes, Tetrahedron. *Tetrahedron* 57: 5585-89
- Dupont R, Goossens JF, Cotelle N, Vrielynck L, Vezin H, et al. 2001a. New bis-catechols 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 9: 229-35
- Dupont R, Jeanson L, Mouscadet JF, Cotelle P. 2001b. Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of catechol and bis-catechol derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 11: 3175-8
- Edwards DJ, Rizk, M.,. 1980. Conversion of 3,4-dihydroxyphenylalanine and deuterated 3,4-dihydroxyphenylalanine to alcoholic metabolites of catecholamines in rat brain. *J. Neurochem.* 36: 1641-47
- Elcock AH. 1998. The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. *Journal of molecular biology* 284: 489-502
- Fahim FA, Esmat AY, Fadel HM, Hassan KF. 1999. Allied studies on the effect of Rosmarinus officinalis L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *International journal of food sciences and nutrition* 50: 413-27
- Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, et al. 2000. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *Journal of neurochemistry* 75: 624-33
- Fauquant C, Redeker V, Landrieu I, Wieruzseski JM, Verdegem D, et al. 2011. Systematic identification of tubulin interacting fragments of the microtubule-associated protein TAU leads to a highly efficient promoter of microtubule assembly. *The Journal of biological chemistry*
- Feng BY, Toyama BH, Wille H, Colby DW, Collins SR, et al. 2008. Small-molecule aggregates inhibit amyloid polymerization. *Nature chemical biology* 4: 197-9

- Feuillette S, Blard O, Lecourtois M, Frebourg T, Campion D, Dumanchin C. 2005. Tau is not normally degraded by the proteasome. *Journal of neuroscience research* 80: 400-5
- Ficarra P, Ficarra R, de Pasquale A, Monforte MT, Calabro ML. 1991. HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L. *Farmaco* 46: 803-15
- Flament S, Delacourte A, Hemon B, Defossez A. 1989. Characterization of two pathological tau protein, variants in Alzheimer brain cortices. *Journal of the neurological sciences* 92: 133-41
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-7
- Friedhoff P, Schneider A, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1998a. Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* 37: 10223-30
- Friedhoff P, von Bergen M, Mandelkow EM, Davies P, Mandelkow E. 1998b. A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15712-7
- Frost B, Jacks RL, Diamond MI. 2009. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *The Journal of biological chemistry* 284: 12845-52
- Furukawa Y, Kaneko K, Nukina N. 2011. Tau protein assembles into isoform- and disulfide-dependent polymorphic fibrils with distinct structural properties. *The Journal of biological chemistry* 286: 27236-46
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, et al. 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 10032-7
- Garcia-Sierra F, Wischik CM, Harrington CR, Luna-Munoz J, Mena R. 2001. Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Journal of chemical neuroanatomy* 22: 65-77
- Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Menendez JA, et al. 2010. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 51: 416-29
- Gauthier S, Aisen PS, Ferris SH, Saumier D, Duong A, et al. 2009. Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study. *The journal of nutrition, health & aging* 13: 550-7
- Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. 2009. Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be or not to be? *Nature immunology* 10: 356-60
- Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. 1984. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* 2: 357-69
- Goedert M, 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: 4225-30
- Goedert M, Jakes R. 2005. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et biophysica acta* 1739: 240-50
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA. 1999. Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS letters* 450: 306-11
- Goedert M, Jakes R, Qi Z, Wang JH, Cohen P. 1995. Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of neurochemistry* 65: 2804-7
- Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA. 1996. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383: 550-3
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3: 519-26

- Golovanov AP, Blankley RT, Avis JM, Bermel W. 2007. Isotopically discriminated NMR spectroscopy: a tool for investigating complex protein interactions in vitro. *Journal of the American Chemical Society* 129: 6528-35
- Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 1994. Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience* 61: 765-72
- Gong CX, Liu F, Wu G, Rossie S, Wegiel J, et al. 2004. Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. *Journal of neurochemistry* 88: 298-310
- Gotz J, Probst A, Spillantini MG, Schafer T, Jakes R, et al. 1995. Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *The EMBO journal* 14: 1304-13
- Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, et al. 2009. Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 302: 2557-64
- Griffith LS, Schmitz B. 1995. O-linked N-acetylglucosamine is upregulated in Alzheimer brains. *Biochemical and biophysical research communications* 213: 424-31
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 4913-7
- Gu Y, Oyama F, Ihara Y. 1996. Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem* 67: 1235-44
- Hagerman AE, Butler LG. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of biological chemistry* 256: 4494-7
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W. 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in molecular medicine* 15: 112-9
- Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-6
- Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y. 1992. Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *The Journal of biological chemistry* 267: 17047-54
- Hashim YZ, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, et al. 2008. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 122: 495-500
- Haslam E. 1974. Polyphenol-protein interactions. *The Biochemical journal* 139: 285-8
- Herzig MC, Van Nostrand WE, Jucker M. 2006. Mechanism of cerebral beta-amyloid angiopathy: murine and cellular models. *Brain Pathol* 16: 40-54
- Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Kobayashi N, Pfister KK, Bloom GS, Brady ST. 1991. Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 114: 295-302
- Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. 1988. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *The Journal of cell biology* 107: 1449-59
- Hortschansky P, Schroeckh V, Christopeit T, Zandomenighi G, Fandrich M. 2005. The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. *Protein science : a publication of the Protein Society* 14: 1753-9
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, et al. 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393: 702-5
- Ii K, Ito H, Kominami E, Hirano A. 1993. Abnormal distribution of cathepsin proteinases and endogenous inhibitors (cystatins) in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease, parkinsonism-dementia complex on Guam, and senile dementia and in the aged. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology* 423: 185-94
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. 2009. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta neuropathologica* 118: 53-69

- Itoh Y, Amano N, Inoue M, Yagishita S. 1997. Scanning electron microscopical study of the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 94: 78-86
- Iuvone T, De Filippis D, Esposito G, D'Amico A, Izzo AA. 2006. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 317: 1143-9
- J. SBL. 1961. On the oleuropein, the bitter principle of olives. . *Journal of Organic Chemistry*. 26: 1948-54
- Jakes R, Novak M, Davison M, Wischik CM. 1991. Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *The EMBO journal* 10: 2725-9
- Jeganathan S, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E. 2008. The natively unfolded character of tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry* 47: 10526-39
- Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1996. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS letters* 399: 344-9
- Kenessey A, Nacharaju P, Ko LW, Yen SH. 1997. Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Journal of neurochemistry* 69: 2026-38
- Khlistunova I, Biernat J, Wang Y, Pickhardt M, von Bergen M, et al. 2006. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *The Journal of biological chemistry* 281: 1205-14
- Kidd M. 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197: 192-3
- Kim J, Lee HJ, Lee KW. 2010. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 112: 1415-30
- King ME, Ahuja V, Binder LI, Kuret J. 1999. Ligand-dependent tau filament formation: implications for Alzheimer's disease progression. *Biochemistry* 38: 14851-9
- Kins S, Cramer A, Evans DR, Hemmings BA, Nitsch RM, Gotz J. 2001. Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 276: 38193-200
- Knowles TP, Waudby CA, Devlin GL, Cohen SI, Aguzzi A, et al. 2009. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* 326: 1533-7
- Konzack S, Thies E, Marx A, Mandelkow EM, Mandelkow E. 2007. Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 9916-27
- Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 1993. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 268: 24374-84
- Kraemer BC, Zhang B, Leverenz JB, Thomas JH, Trojanowski JQ, Schellenberg GD. 2003. Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 9980-5
- Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH. 1992. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain research* 597: 209-19
- Ksiezak-Reding H, Yen SH. 1991. Structural stability of paired helical filaments requires microtubule-binding domains of tau: a model for self-association. *Neuron* 6: 717-28
- Kuret J, Chirita CN, Congdon EE, Kannanayakal T, Li G, et al. 2005. Pathways of tau fibrillization. *Biochimica et biophysica acta* 1739: 167-78
- Lee G, Cowan N, Kirschner M. 1988. The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239: 285-8

- Lee G, Thangavel R, Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K, et al. 2004. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 2304-12
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annual review of neuroscience* 24: 1121-59
- Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussiere T, Dupire MJ, et al. 2003. Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochimica et biophysica acta* 1619: 167-76
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, et al. 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature genetics* 25: 402-5
- Li SW, Lin TS, Minter S, Burke WJ. 2001. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and hydrogen peroxide generate a hydroxyl radical: possible role in Parkinson's disease pathogenesis. *Brain research. Molecular brain research* 93: 1-7
- Li W, Sperry JB, Crowe A, Trojanowski JQ, Smith AB, 3rd, Lee VM. 2009. Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau. *Journal of neurochemistry* 110: 1339-51
- Litersky JM, Scott CW, Johnson GV. 1993. Phosphorylation, calpain proteolysis and tubulin binding of recombinant human tau isoforms. *Brain Res* 604: 32-40
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. 2005. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22: 1942-50
- Luck G, Liao H, Murray NJ, Grimmer HR, Warminski EE, et al. 1994. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry* 37: 357-71
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama S, Ikai A, Takashima A. 2006. Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience research* 54: 197-201
- Magnani E, Fan J, Gasparini L, Golding M, Williams M, et al. 2007. Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J* 26: 4546-54
- Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J, Mandelkow EM. 2007. Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 17: 83-90
- Mandelkow EM, Mandelkow E. 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8: 425-7
- Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E. 2003. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* 24: 1079-85
- Marchitti SA, Deitrich RA, Vasiliou V. 2007. Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacological reviews* 59: 125-50
- Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, et al. 2006. Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry* 45: 6085-94
- Matenia D, Mandelkow EM. 2009. The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends in biochemical sciences* 34: 332-42
- Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, et al. 1994. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13: 989-1002
- Mattson MP. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77: 1081-132
- Maurin CB, F.; Cotelle, P. 2005. Facile Access to Methoxylated 2-Phenyl-naphthalenes and Epoxydibenzocyclooctenes *Tetrahedron* 61: 7054-58
- Mazanetz MP, Fischer PM. 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 6: 464-79
- McDermott MF. 1999. Autosomal dominant recurrent fevers. Clinical and genetic aspects. *Rev Rhum Engl Ed* 66: 484-91

- Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, et al. 2009. Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *International journal of oncology* 34: 43-51
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451: 1069-75
- Montedoro G, Petruccioli G. 1972. [Enzymatic treatment in the extraction of olive oil by mechanical means]. *Acta vitaminologica et enzymologica* 26: 171-80
- Montejo de Garcini E, Avila J. 1987. In vitro conditions for the self-polymerization of the microtubule-associated protein, tau factor. *Journal of biochemistry* 102: 1415-21
- Montejo de Garcini E, Serrano L, Avila J. 1986. Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochemical and biophysical research communications* 141: 790-6
- Monti MC, Margarucci L, Tosco A, Riccio R, Casapullo A. 2011. New insights on the interaction mechanism between tau protein and oleocanthal, an extra-virgin olive-oil bioactive component. *Food & function* 2: 423-8
- Moreno FJ, Medina M, Perez M, Montejo de Garcini E, Avila J. 1995. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates recombinant human tau protein at serine-262 in the presence of heparin (or tubulin). *FEBS letters* 372: 65-8
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, et al. 1995. Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiology of aging* 16: 365-71; discussion 71-80
- Mukrasch MD, Biernat J, von Bergen M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M. 2005. Sites of tau important for aggregation populate {beta}-structure and bind to microtubules and polyanions. *The Journal of biological chemistry* 280: 24978-86
- Mukrasch MD, von Bergen M, Biernat J, Fischer D, Griesinger C, et al. 2007. The "jaws" of the tau-microtubule interaction. *The Journal of biological chemistry* 282: 12230-9
- Mulot SF, Hughes K, Woodgett JR, Anderton BH, Hanger DP. 1994. PHF-tau from Alzheimer's brain comprises four species on SDS-PAGE which can be mimicked by in vitro phosphorylation of human brain tau by glycogen synthase kinase-3 beta. *FEBS letters* 349: 359-64
- Murray NJ, Williamson MP, Lilley TH, Haslam E. 1994. Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy. *European journal of biochemistry / FEBS* 219: 923-35
- Ocakoglu D. TF, Ozen B. & Korel F. 2009. Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*. 15: 401-10
- Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM. 2004. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* 43: 321-32
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, et al. 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39: 409-21
- Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. 2004. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Journal of neuroscience research* 75: 742-50
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. 2003. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 87: 172-81
- Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, et al. 1997. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Revue neurologique* 153: 185-92

- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalter B, Bartsch H. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer* 36: 1235-47
- Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L. 2003. Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 9548-53
- Park SY, Ferreira A. 2005. The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 5365-75
- Paschal BM, Vallee RB. 1987. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* 330: 181-3
- Paudel HK, Li W. 1999. Heparin-induced conformational change in microtubule-associated protein Tau as detected by chemical cross-linking and phosphopeptide mapping. *The Journal of biological chemistry* 274: 8029-38
- Perez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E, Avila J. 1996. Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *Journal of neurochemistry* 67: 1183-90
- Perry G, Friedman R, Kang DH, Manetto V, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. 1987. Antibodies to the neuronal cytoskeleton are elicited by Alzheimer paired helical filament fractions. *Brain research* 420: 233-42
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. 1995. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis research* 78: 151-60
- Pickhardt M, Gazova Z, von Bergen M, Khlistunova I, Wang Y, et al. 2005. Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. *The Journal of biological chemistry* 280: 3628-35
- Poncet-Legrand C, Gautier C, Cheynier V, Imberty A. 2007. Interactions between flavan-3-ols and poly(L-proline) studied by isothermal titration calorimetry: effect of the tannin structure. *Journal of agricultural and food chemistry* 55: 9235-40
- Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, et al. 1998. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals of neurology* 43: 815-25
- Probst A, Langui D, Lautenschlager C, Ulrich J, Brion JP, Anderton BH. 1988. Progressive supranuclear palsy: extensive neuropil threads in addition to neurofibrillary tangles. Very similar antigenicity of subcortical neuronal pathology in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 77: 61-8
- Probst A, Tolnay M, Langui D, Goedert M, Spillantini MG. 1996. Pick's disease: hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment. *Acta neuropathologica* 92: 588-96
- Ramesh BN, Rao TS, Prakasam A, Sambamurti K, Rao KS. 2010. Neuronutrition and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19: 1123-39
- Richard T, Pawlus AD, Iglesias ML, Pedrot E, Waffo-Teguo P, et al. 2011. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215: 103-8
- Rigacci S, Guidotti V, Bucciantini M, Nichino D, Relini A, et al. 2011. Aβ(1-42) Aggregates into non-Toxic Amyloid Assemblies in the Presence of the Natural Polyphenol Oleuropein Aglycon. *Current Alzheimer research*
- Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, et al. 2004. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *The Journal of clinical investigation* 114: 121-30
- Riviere C, Papastamoulis Y, Fortin PY, Delchier N, Andriamanarivo S, et al. 2010. New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20: 3441-3

- Romero C, Brenes M, Garcia P, Garrido A. 2002. Hydroxytyrosol 4-beta-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of agricultural and food chemistry* 50: 3835-9
- Rotondo S, de Gaetano G. 2000. Protection from cardiovascular disease by wine and its derived products. Epidemiological evidence and biological mechanisms. *World review of nutrition and dietetics* 87: 90-113
- Sandler M, Carter SB, Hunter KR, Stern GM. 1973. Tetrahydroisoquinoline alkaloids: in vivo metabolites of L-dopa in man. *Nature* 241: 439-43
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, et al. 2005. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309: 476-81
- Sarni-Manchado P, Cheynier V, Moutounet M. 1999. Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of agricultural and food chemistry* 47: 42-7
- Sato S, Tatebayashi Y, Akagi T, Chui DH, Murayama M, et al. 2002. Aberrant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. *J Biol Chem* 277: 42060-5
- Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM. 1999. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 38: 3549-58
- Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E. 1995. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 8463-7
- Schweers O, Schonbrunn-Hanebeck E, Marx A, Mandelkow E. 1994. Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem* 269: 24290-7
- Scott CW, Blowers DP, Barth PT, Lo MM, Salama AI, Caputo CB. 1991. Differences in the abilities of human tau isoforms to promote microtubule assembly. *J Neurosci Res* 30: 154-62
- Selkoe DJ. 2003. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochemical research* 28: 1705-13
- Sergeant N, Delacourte A, Buee L. 2005. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et biophysica acta* 1739: 179-97
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, et al. 1995. Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *The Journal of biological chemistry* 270: 18917-22
- Shohat M, Magal N, Shohat T, Chen X, Dagan T, et al. 1999. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *European journal of human genetics : EJHG* 7: 287-92
- Sibille N, Sillen A, Leroy A, Wieruszeski JM, Mulloy B, et al. 2006. Structural impact of heparin binding to full-length Tau as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 45: 12560-72
- Siebert KJ. 1999. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 47: 353-62
- Sillen A, Leroy A, Wieruszeski JM, Loyens A, Beauvillain JC, et al. 2005. Regions of tau implicated in the paired helical fragment core as defined by NMR. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 6: 1849-56
- Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17: 2653-7
- Soler-Rivas C, EJCWHJ. 2000. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1013-23

- Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Torres F, et al. 2006. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiology of aging* 27: 1694-704
- Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Del Parigi A, et al. 2005. Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia. *Experimental gerontology* 40: 257-70
- Spillantini MG, Goedert M. 1998. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences* 21: 428-33
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. 1998. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7737-41
- Staff RT. 2008. Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with Rember™ arrests the trajectory of rCBF decline in brain regions affected by Tau pathology in mild and moderate Alzheimer's disease (AD). *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 4: T775
- Stoothoff WH, Johnson GV. 2005. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochimica et biophysica acta* 1739: 280-97
- Sutton MA, Schuman EM. 2005. Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J Neurobiol* 64: 116-31
- Sweeney DG, Nixon JB, Cromar NJ, Fallowfield HJ. 2005. Profiling and modelling of thermal changes in a large waste stabilisation pond. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 51: 163-72
- Takahashi M, Tsujioka Y, Yamada T, Tsuboi Y, Okada H, et al. 1999. Glycosylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer's disease brain. *Acta neuropathologica* 97: 635-41
- Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, et al. 2005. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *The Journal of biological chemistry* 280: 7614-23
- Terwel D, Muyllaert D, Dewachter I, Borghgraef P, Croes S, et al. 2008. Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *The American journal of pathology* 172: 786-98
- Thiede HM, Kehr W. 1981. Catecholamine metabolism in rat brain. The role of neutral and acidic catechol metabolites. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 318: 29-35
- Trinczek B, Ebner A, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1999. Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* 112 (Pt 14): 2355-67
- Tuck KL, Hayball PJ. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of nutritional biochemistry* 13: 636-44
- Utton MA, Noble WJ, Hill JE, Anderton BH, Hanger DP. 2005. Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *J Cell Sci* 118: 4645-54
- Uversky VN, Li J, Fink AL. 2001. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *The Journal of biological chemistry* 276: 10737-44
- Visanji JM, Thompson DG, Padfield PJ. 2006. Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer letters* 237: 130-6
- Visioli F, Galli C. 1998. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition reviews* 56: 142-7
- Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, et al. 2003. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *The Journal of nutrition* 133: 2612-5
- von Bergen M, Barghorn S, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 2005. Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochimica et biophysica acta* 1739: 158-66

- von Bergen M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J, et al. 2001. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *The Journal of biological chemistry* 276: 48165-74
- von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 2000. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5129-34
- Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 1995. Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *The Journal of biological chemistry* 270: 4854-60
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2007a. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *The European journal of neuroscience* 25: 59-68
- Wang YP, Biernat J, Pickhardt M, Mandelkow E, Mandelkow EM. 2007b. Stepwise proteolysis liberates tau fragments that nucleate the Alzheimer-like aggregation of full-length tau in a neuronal cell model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 10252-7
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 1858-62
- Wille H, Drewes G, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1992. Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *The Journal of cell biology* 118: 573-84
- Wilson DM, Binder LI. 1997. Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 150: 2181-95
- Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR. 1996. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 11213-8
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA. 1988. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 4884-8
- Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, et al. 2001. Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293: 711-4
- Wu YT, Lin LC, Tsai TH. 2009. Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of chromatography. A* 1216: 3501-7
- Xu CL, Sim MK. 1995. Reduction of dihydroxyphenylacetic acid by a novel enzyme in the rat brain. *Biochemical pharmacology* 50: 1333-7
- Yang D. P. KDXZHY. 2007. Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry*. 104: 1269-71
- Yao TM, Tomoo K, Ishida T, Hasegawa H, Sasaki M, Taniguchi T. 2003. Aggregation analysis of the microtubule binding domain in tau protein by spectroscopic methods. *Journal of biochemistry* 134: 91-9
- Zachara NE, Hart GW, Cole RN, Gao Y. 2002. Detection and analysis of proteins modified by O-linked N-acetylglucosamine. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* Chapter 17: Unit 17 6
- Zhang JY, Liu SJ, Li HL, Wang JZ. 2005. Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/Mg(2+)-dependent proteasome protease system. *J Neural Transm* 112: 547-55