



Fonctions atypiques de la protéine Tau : rôles dans la protection des acides nucléiques et le métabolisme des ARN

Alban Chauderlier

► To cite this version:

Alban Chauderlier. Fonctions atypiques de la protéine Tau : rôles dans la protection des acides nucléiques et le métabolisme des ARN. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S054 . tel-02613476

HAL Id: tel-02613476

<https://theses.hal.science/tel-02613476>

Submitted on 20 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Lille
Université de Lille II – Droit et santé

Ecole Doctorale Biologie et Santé de Lille

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Spécialité : Neurosciences

Présentée par :

Alban Chauderlier

Fonctions atypiques de la protéine Tau : Rôles dans la protection des acides nucléiques et le métabolisme des ARN.

Soutenue publiquement le 16 décembre 2016 devant le jury composé de :

Mr le Pr Jacques Hugon

Mme le Dr Dominique Weil

Mme le Dr Eliette Bonnefoy

Mr le Dr Bruno Lefebvre

Mr le Pr Didier Vieau

Mme le Dr Marie-Christine Galas

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

« Le seul héritage qui fut dans tous les tems à l’abri des caprices du sort, et avec lequel celui qui sait le faire valoir n’éprouve jamais le besoin, parvient souvent à l’aisance et quelquefois même à la fortune. »

J-M Cassini - « *Eloge de M. Guillaume Le Gentil* », 1810, à propos de l’éducation.

A mes parents.

Remerciements

En premier lieu, je souhaite exprimer mes profonds remerciements à l'ensemble de mon jury, le Pr Jacques Hugon, le Dr Dominique Weil, le Dr Eliette Bonnefoy, le Dr Bruno Lefebvre et le Pr Didier Vieau pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement le Pr Jacques Hugon et le Dr Dominique Weil pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr Eliette Bonnefoy ainsi qu'au Dr Dominique Weil. Merci pour le temps que vous m'avez accordé, vos précieux conseils, votre aide, vos encouragements et votre bienveillance.

Je tiens à remercier le Dr Luc Buée de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci pour vos conseils scientifiques avisés. Je vous remercie également pour les moments de labo, toujours agréables, que vous entretenez au sein de l'équipe et du centre.

Je remercie chaleureusement le Dr Marie-Christine Galas. Vous m'avez accueilli, à la fin de mon master I. J'ai beaucoup appris à vos côtés, que ce soit scientifiquement ou humainement. J'en profite pour exprimer ma sincère reconnaissance pour l'opportunité que vous m'avez offerte de travailler dans d'excellentes conditions dans un laboratoire de sciences.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers le Dr Bruno Lefebvre, pour vos conseils, qu'ils soient scientifiques, humains ou cyclistes. J'ai apprécié travailler avec vous, apprécié votre disponibilité, votre franchise dans les bons ou les mauvais moments.

Marie, Bruno, je profite de cette occasion pour vous exprimer ma gratitude de m'avoir encadré. Je sais, ô combien, que cela peut être compliqué....

Un grand merci à l'ensemble des chercheurs, David Blum, Valérie Buée, Marie-Laure Caillet-Boudin, Morvane Colin, Malika Hamdane, Sandrine Humez, Bernard Sablonnière, Nicolas Sergeant et Valérie Vingt-Deux qui ne ménagent pas leurs efforts pour nous former.

J'en profite pour remercier vivement le Dr. Marie-Claire Peers, qui m'a offert la possibilité d'être moniteur de TD. Merci pour tout ce que vous nous apportez que ce soit histologiquement, humainement ou autour d'une crêpe. Merci, au passage à Julien pour les goûters à l'inter-cours.

Lucie ! Merci pour le temps que tu as passé à me former, tu n'as jamais renoncé ! Merci pour ta sympathie et ton enthousiasme ! Merci Marie, pour ta sympathie, ta bienveillance et pour tes conseils ! Ma gratitude envers Andrea, qui a participé à la réussite de mon travail. Je

remercie vivement Marie-Hélène Gevaert pour son aide technique, sa disponibilité ainsi que l'ensemble des membres de l'animalerie.

Un grand merci à Francisco ! Merci pour tes conseils scientifiques, ta bienveillance et ta science du football toute hispanique !

J'adresse un grand merci à la bonne humeur de Méliza, qui m'a beaucoup aidé, soutenu et amusé !

Merci au bureau du fond ! Merci Dominique, tu as été une superbe camarade ! C'était agréable d'être ton voisin de bureau. Merci Coline, pour ton soutien, pour le temps que tu as passé à nous filer des coups de main, t'es quelqu'un de chouette ! Dans le genre chouette, je remercie Toto, on a passé 4 années à vivre, à peu près les mêmes choses, tu as toujours été un soutien de poids, quoi qu'il arrive, *ses fluctuat nec mergitur.... (guitares)*. Un gros merci à Mathilde également, désolé de t'avoir fait porter le chapeau au sujet du camembert... Un autre chapeau à Alex, tes réflexions permanentes sur les protocoles, nous ont tiré vers le haut ! Merci Espérance, pour ton sourire au quotidien. Merci à Caro et Florian pour votre bonne humeur et votre science de la vanne (notamment).

Je souhaite remercier Mélissa, toujours sympa et prompte à aider ! Bon courage à toi ! Tu es bien partie ! Un gros merci à Claire pour ses blagues et sa curiosité scientifique ! Avec Marie-Line, toujours bienveillante, vous êtes un super duo.

Je remercie également les anciens, Antoine, Cyril, Simon et Max, pour votre humour et pour nous avoir accueilli chaleureusement au sein du laboratoire. Un petit mot pour remercier Sebastien, toujours sourire, un compagnon de RU hors-pair !

Ma gratitude s'adresse à l'ensemble de l'équipe, je m'excuse par avance si je venais à oublier un prénom. Vous m'avez beaucoup apporté humainement et scientifiquement, je quitte le labo avec un petit pincement au cœur. Merci Raph, Sabiha, Lucrezia, Catherine, Sabrina, Roby, Séverine, Hélène, Charlotte, Vanessa, Laetitia, Emilie, Claudia, Seb, Xabier, Florian, Laura, Kevin, Mégane et Caroline bien sûr !!! Merci Vanessa, Alex et Matthias !

Un gros merci à Thomas et Karim ainsi qu'au secrétariat, Céline, Michèle, Nathalie et Sophie pour leur bienveillance et leur disponibilité et qui, par leur travail, nous permettent d'évoluer dans de très bonnes conditions au sein du laboratoire.

Enfin, je remercie celles et ceux qui me sont chers et qui ont suivi de près ou de loin l'avancée de ma thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de ces années. Ils sont trop nombreux pour tous les citer. Aux copains ! A Emeline pour ton sourire et ton soutien 3000 ! Encore de nombreuses semelles à user, de films à développer, de ballons à aller chercher et de ripailles à partager.

Résumé

Les tauopathies, dont la maladie d'Alzheimer (MA) est l'exemple le plus connu, sont des maladies neurodégénératives caractérisées par une agrégation intra-neuronale progressive de protéine Tau hyperphosphorylée conduisant inéluctablement à la mort du neurone. De nombreuses études convergent vers une implication du stress oxydant comme l'un des mécanismes précoces à l'origine de la MA. En effet, une accumulation de dommages oxydatifs aux acides nucléiques est observée aux stades précoces de la MA. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette altération de l'intégrité des acides nucléiques au cours de la MA restent obscurs. Outre son rôle connu dans la stabilisation des microtubules, Tau est un acteur essentiel de la protection de l'intégrité des acides nucléiques neuronaux. En effet, au sein du laboratoire, il a été récemment montré *in vivo* que Tau protège l'ADN et l'ARN en condition physiologique ainsi qu'au cours d'un stress hyperthermique, un outil inducteur de stress oxydant. Aucune étude n'a été menée pour examiner l'effet de la pathologie Tau sur la fonction protectrice de Tau vis-à-vis des acides nucléiques (AN).

Cette problématique constitue le premier objectif de cette thèse. Pour cela, nous avons utilisé un modèle murin qui développe une agrégation et une hyperphosphorylation progressive de la protéine Tau : les souris THY-Tau22. Nous avons démontré, dans ce modèle, que l'hyperthermie induit des dommages aux AN uniquement dans les neurones présentant une pathologie précoce, à des stades qui précèdent la formation d'agrégats insolubles de Tau. Au sein de ces neurones, ces dommages aux AN induits par l'hyperthermie sont strictement corrélés à la formation d'oligomères de protéines Tau, formes précoces de l'agrégation de Tau. Une association similaire entre la présence d'oligomères de Tau et des dommages oxydatifs a également été mise en évidence dans des cerveaux de patients atteints de la MA. Le pré-traitement de ces souris avec du bleu de méthylène, un antioxydant et inhibiteur de l'agrégation de Tau, prévient la formation de ces oligomères ainsi que les dommages aux acides nucléiques. Ces résultats suggèrent que l'oligomérisation de Tau prévient la fonction protectrice de Tau vis-à-vis des acides nucléiques. Ce travail met également en lumière l'existence d'une fenêtre critique de vulnérabilité de l'ADN et l'ARN au cours de la progression de la pathologie. Dans le deuxième volet de ce manuscrit, nous nous sommes concentrés sur la relation entre la protéine Tau et l'ARN. Bien que l'interaction de Tau avec l'ARN soit connue depuis une vingtaine d'années, la fonction de cette interaction reste obscure. Notre hypothèse est que Tau

pourrait être impliquée dans le métabolisme des ARN. Par stratégie TAP-tag, des partenaires protéiques de Tau ont été purifiés. Parmi eux, la protéine DEAD box protein 6 (DDX6), un acteur du métabolisme des ARN, a été identifiée comme un nouveau partenaire de Tau. DDX6 est une hélicase à ARN impliquée notamment dans la voie de régulation de l'expression génique par les microARN. Ce second projet vise à caractériser, comprendre la fonction de ce complexe ainsi que son impact dans la pathogénèse des tauopathies. Nous avons confirmé l'interaction entre Tau et DDX6 puis identifié les séquences de Tau impliquées dans ce complexe. Nos résultats suggèrent que l'interaction de Tau avec DDX6 stimule l'activité du microARN Let-7a. De manière particulièrement intéressante, des mutations de Tau responsables de formes familiales de tauopathies altèrent l'interaction Tau/DDX6 et abolissent l'effet de Tau sur l'activité du microARN Let-7a. L'ensemble de ces résultats met en évidence un rôle atypique de Tau, non décrit à ce jour, dans la voie de régulation du microARN Let-7a. Cette nouvelle fonction ouvre des perspectives sur le rôle de Tau dans le métabolisme des ARN et suggère un impact de la pathologie Tau sur la régulation de la voie des microARN.

Abstract

Tauopathies are neurodegenerative disorders characterized by a progressive intraneuronal accumulation of hyperphosphorylated Tau leading to neuronal death. The most well-known tauopathy is Alzheimer Disease (AD). Numerous studies suggest that oxidative stress is one of the early mechanisms involved in AD. An increase in oxidative DNA and RNA damage occurs at early stages of AD. The mechanisms underlying the alteration of nucleic acid integrity during the course of AD are unclear. In addition to its well-described role in microtubule stabilization, Tau is an essential player in the protection of neuronal nucleic acid integrity. Indeed, we recently reported that Tau protect DNA and RNA integrity *in vivo* under physiological and hyperthermic conditions, which is known to be a strong inducer of oxidative stress. However, no study has been conducted to test the effects of Tau pathology on the protective function of Tau. This is the first objective of my thesis.

To do that, we used a transgenic Tau pathology mouse model. With age, these mice develop a progressive Tau hyperphosphorylation and aggregation. We demonstrate, in this model, that hyperthermia selectively induces nucleic acid damage in neurons that display early Tau pathology without Tau fibrils. In these neurons, nucleic acid damage is strictly correlated with prefibrillar Tau oligomers. A similar association between prefibrillar Tau oligomers and nucleic acid oxidative damage was observed in AD brains. Pretreatment with Methylene Blue (MB), a Tau aggregation inhibitor reduced hyperthermia-induced Tau oligomerization as well as nucleic acid damage. These results suggest that Tau oligomerization triggers the loss of the nucleic acid protective function of Tau. This study highlights the existence of a critical window of DNA and RNA vulnerability during the progression of Tau pathology.

In the second part of this manuscript, we have focused on the relationship between Tau and RNA. It has been reported that Tau bind to RNA. Although this interaction has been known for 20 years, the function of this interaction is still unclear. Based on this observation, we hypothesize that Tau is involved in RNA metabolism. Proteins interacting with Tau have been purified using the tandem affinity purification methodology. Thus, the DEAD box protein 6 (DDX6), known to be an actor of RNA metabolism, has been identified as a new Tau partner. DDX6 is a RNA helicase implicated in miRNA gene silencing mechanism. This project aims to understand Tau-DDX6 complex function in physiological conditions and its impact on tauopathies. We validate the interaction between Tau and DDX6, and identify Tau sequences

involved in the interaction. Our results suggest that Tau-DDX6 complex enhance Let-7a activity. Interestingly, Tau mutations involved in inherited tauopathies impair Tau-DDX6 interaction and abolish the effect of Tau on Let-7a activity. All these results highlight a new and atypical function of Tau in microRNA pathway. This undescribed function offers promising prospects for the role of Tau in RNA metabolism and suggest a potential impact of Tau pathology on regulation of microRNA pathway.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : Physiologie et Pathologie de la protéine Tau.	2
A. La physiologie de la protéine Tau.....	3
I. Du gène à la protéine.....	3
1 Les différentes isoformes de la protéine Tau.....	4
2 Structure de la protéine Tau.....	5
a Le domaine de liaison aux microtubules	6
b Le domaine de projection	6
3 Aspects conformationnels.....	8
II. Localisation et fonctions	9
1 Tau est une protéine cytosolique.....	10
a Tau et le cytosquelette	10
b Tau et transport axonal	11
c Tau, neurogénèse et croissance neuritique	12
d Tau, signalisation cellulaire et plasticité synaptique	14
2 Tau est une protéine nucléaire	14
a Localisation de Tau dans le noyau des cellules	15
b Interaction de Tau avec les acides nucléiques	15
c Fonction de la protéine Tau nucléaire	16
i. Un rôle nucléolaire ?	17
ii. Tau régulateur transcriptionnel ?	17
iii. Tau protecteur des acides nucléiques.	18
3 Une fonction extra-cellulaire de Tau ?	19
4 Tau, une protéine impliquée dans le métabolisme des ARN ?	19
III. Régulation de la fonction de Tau par des modifications post-traductionnelles	21
1 La phosphorylation de Tau	22
a Les kinases.....	22
b Les phosphatases	22
c La phosphorylation : Régulation des fonctions de Tau	23
2 Autres modifications post-traductionnelles	24
B. La physiopathologie de la protéine Tau	25
I. Les tauopathies	26

1	Classification	26
a	Point de vue clinique	26
b	Considérations neuropathologiques	27
2	Maladie d'Alzheimer	29
a	Quelques données épidémiologiques	29
b	Définition clinique.....	30
c	Neuropathologie.....	30
i.	Les plaques amyloïdes.....	32
ii.	Les dégénérescences neurofibrillaires.....	34
d	Une maladie multifactorielle	35
e	L'hypothèse de la cascade amyloïde : la pathologie Tau est-elle un épiphénomène ?	36
3	DLFT liée au chromosome 17	37
4	Le stress oxydant, phénomène commun aux Tauopathies	37
II.	Hyperphosphorylation et agrégation de Tau : mécanismes pathologiques communs aux tauopathies	39
1	Des mutations du gène MAPT promotrices de la pathologie Tau	39
2	L'agrégation de la protéine Tau.....	40
3	L'hyperphosphorylation de la protéine Tau	42
4	Hyperphosphorylation et agrégation de la protéine Tau, un lien de causalité ? ...	43
5	Rôle du stress oxydant dans les mécanismes d'oligomérisation de la protéine Tau	45
III.	Retentissement physiopathologique de l'agrégation de Tau	46
1	Un gain de fonction toxique	46
a	Agrégat ou oligomères ? quelle est la forme toxique ?	47
b	Propagation de la pathologie Tau.....	48
c	Un exemple de gain de fonction toxique : la dysfonction du transport axonal ..	50
d	Une perturbation du métabolisme des ARN ?	50
2	Une perte de fonction	51
a	La pathologie Tau et les microtubules	52
b	La pathologie Tau et la synapse	52
c	La pathologie Tau et les acides nucléiques.....	53
	Chapitre 2 : Structure & Rôle de l'hélicase DDX6	55
A.	Généralités autour de DDX6, une hélicase à boîte DEAD	56
I.	Introduction aux protéines à boîte DEAD	56
II.	Structure des hélicases à boîte DEAD	57

1	Les motifs impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP.....	58
2	Des motifs impliqués dans la liaison à l'ARN.....	59
3	Aspects conformationnels.....	59
4	D'autres domaines remarquables	60
III.	Des hélicases non conventionnelles	61
IV.	Localisation de DDX6.....	61
B.	Fonctions de DDX6	62
I.	Rôle de DDX6 dans la régulation de la traduction	63
1	Quelques mots sur le modèle canonique d'initiation de la traduction chez les eucaryotes.....	64
a	Formation du complexe de pré-initiation 43S et liaison à l'ARN	64
b	Balayage de la région 5' non traduite.....	65
c	Assemblage du ribosome 80S	66
2	Régulation de la traduction par des éléments IRES	68
3	Régulation de l'initiation de la traduction par des protéines interagissant avec la région 3'UTR.....	68
4	Interaction de DDX6 avec des complexes répresseurs de la traduction	69
a	La répression de la traduction par le complexe CPEB.....	69
b	D'autres complexes répresseurs de la traduction	70
II.	Rôle de DDX6 dans la stabilité des ARN	72
1	La déadénylation : voie majeure de la dégradation des ARNm eucaryotes	72
a	La déadénylation	72
b	Le décoiffage	73
2	Implication de DDX6 dans la déadénylation.....	73
3	Implication de DDX6 dans le decapping.....	74
4	Rôle de DDX6 dans la régulation de la stabilité d'ARNm spécifiques par les « adenylate-uridylylate-rich elements »	74
III.	Rôle de DDX6 dans la voie des microARN	75
1	Biogénèse des microARN	75
2	Mécanismes d'extinction de l'expression d'un gène par les microARN : rôle de DDX6.....	77
a	Dégradation d'ARNm cible de miARN	77
b	Répression de la traduction d'ARNm cible de miARN	79
IV.	Rôle de DDX6 dans les processing bodies et les granules de stress.	80
1	Les processing bodies.....	81
a	Composition des processing bodies	81

b	Formation des processing bodies	81
c	Fonctions des processing bodies	82
2	Les granules de stress	83
	Objectifs.....	85
	Résultats.....	87
	Etude 1 : Impact de la pathologie Tau sur la fonction protectrice de Tau vis-à-vis des acides nucléiques in vivo.....	88
A.	Introduction	89
B.	Résultats	91
C.	Discussion	124
	Etude 2 : Rôle du complexe Tau-DDX6 dans le métabolisme des ARN	128
A.	Introduction	129
B.	Matériel et méthodes	130
C.	Résultats	136
D.	Discussion & Perspectives	156
	Conclusion.....	161
	Bibliographie.....	163
	Annexes.....	197
	Contributions scientifiques.	

Liste des Figures

Introduction

Figure 1 - Du gène *MAPT* à la protéine Tau.

Figure 2 - La structure primaire de Tau.

Figure 3 - Conformation de la protéine Tau40 (2+3+10+) à l'état natif en solution révélée par Résonance Magnétique Nucléaire.

Figure 4 - Tau se lie aux microtubules, stabilise et promeut la dynamique microtubulaire.

Figure 5 - Tau participe au transport axonal.

Figure 6 - Schéma récapitulatif des fonctions physiologiques de la protéine Tau.

Figure 7 - Différents aspects des inclusions de protéines Tau dans différentes tauopathies.

Figure 8 - Le code-barre des tauopathies.

Figure 9 - Comparaison neuro-anatomique du cerveau d'un sujet contrôle et d'un patient Alzheimer.

Figure 10 - Lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Figure 11 - Protéolyse de l'APP.

Figure 12 - Progression des plaques amyloïdes au cours de la pathologie Alzheimer.

Figure 13 - Progression de la dégénérescence neurofibrillaire au cours de la maladie d'Alzheimer.

Figure 14 - Mutations du gène *MAPT*.

Figure 15 - Modèle de fibrillogénèse de la protéine Tau.

Figure 16 - Position des sites de phosphorylation de la protéine Tau extraite de cerveau Alzheimer.

Figure 17 - Modèle de fibrillogénèse de la protéine Tau sous l'effet de l'hyperphosphorylation.

Figure 18 - Conséquences de la perte de fonction ou du gain de fonction pathologique de Tau.

Figure 19 - Structure de la protéine DDX6.

Figure 20 - Structure générale d'un ARNm eucaryote mature.

Figure 21 - Formation du complexe de pré-initiation 43S et liaison à l'ARN.

Figure 22 - Balayage de la région 5' non traduite.

Figure 23 - Assemblage du ribosome 80S.

Figure 24 - Implication de DDX6 au sein de complexes répresseurs de la traduction.

Figure 25 - La déadénylation : voie majeure de la dégradation des ARNm.

Figure 26 - Biogénèse des micro-ARN.

Figure 27 - Modèle d'une implication de DDX6 dans la dégradation d'ARN cibles de miARN.

Figure 28 - Modèle d'une implication de DDX6 dans la répression de la traduction d'ARN cibles de miARN.

Etude 1 : Impact de la pathologie Tau sur la fonction protectrice de Tau vis-à-vis des acides nucléiques in vivo

Figure 1 - Hyperthermia generates nucleic acid strand breaks and oxidative damage selectively in neuronal nuclei expressing early Tau pathology.

Figure 2 - Hyperthermia induces DNA and RNA damage in neurons with early Tau pathology.

Figure 3 - Hyperthermia promotes Tau phosphorylation in nuclear and cytoplasmic nucleic acid-damaged neurons.

Figure 4 - Hyperthermia-induced nucleic acid damage is associated with the accumulation of prefibrillar Tau oligomers.

Figure 5 - Oxidative nucleic acid damage is associated with prefibrillar Tau oligomers in the AD brain.

Figure 6 - MB prevents hyperthermia-induced Tau oligomerization and nucleic acid damage.

Etude 2 : Rôle du complexe Tau-DDX6 dans le métabolisme des ARN

Figure 1 - Mise en évidence de l'interaction Tau/DDX6 par TAP tag dans la fraction nucléaire (A), la fraction cytosolique(B) et le lysat (C) de lignée SH-SY5Y sur-exprimant ou non les isoformes de Tau 37N et 46N.

Figure 2 - Co-purification du complexe Tau/DDX6 formé *in vitro* par GST-pulldown.

Figure 3 - Co-marquage Tau et DDX6 dans des cellules SH-SY5Y.

Figure 4 - Proximity Ligation Assay Tau/DDX6 dans des cellules SH-SY5Y.

Figure 5 - Analyse des domaines de Tau impliqués dans son interaction avec DDX6.

Figure 6 - Analyse des domaines de Tau impliqués dans son interaction avec DDX6.

Figure 7 - Analyse des acides aminés de Tau impliqués dans son interaction avec DDX6.

Figure 8 - Effet des mutations V226G, V229G, K311G, K317G, K321G sur l'interaction de la protéine Tau pleine taille avec DDX6.

Figure 9 - Effet des mutations P301L et P301S sur l'interaction de la protéine Tau avec DDX6.

Figure 10 - Principe de fonctionnement du système tethering.

Figure 11 - Tau ne module pas l'effet répresseur de la traduction de DDX6 dans notre système expérimental de tethering assay.

Figure 12 - Tau ne module pas l'effet répresseur de la traduction de DDX6 dans notre système expérimental de tethering assay en conditions de privation de serum de veau fœtal (A) et lors d'une activité neuronale prolongée (B).

Figure 13 - Tau stimule l'activité de Let-7a.

Figure 14 - Tau réprime la traduction de c-Myc, un ARNm cible de let-7a.

Figure 15 - L'effet activateur de Tau sur l'activité de let-7a est dépendant de DDX6.

Figure 16 - Le mutant Tau P301S abolit l'effet de Tau sur l'activité de let-7a.

Abréviations

4E-T	4E-Transporter
8-OH(d)G	8-Hydroxy(désoxy)guanosine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AN	Acide Nucléique
APOE	Apolipoprotéine E
APP	Protéine Precurseur de l'Amyloïde
ARE	Adenylate-Uridylate-Rich Elements
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
A β	Amyloid Beta
BrdU	Bromodésoxyuridine
BRE	Bruno Response Element
CaMKII	Calcium/Calmodulin-activated Protein Kinase II
CDK5	Cyclin-Dependent-Like Kinase-5
CK1	Casein Kinase 1
CNOT1	CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 1
CPEB	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein
DCP1/2	mRNA-decapping enzyme 1/2
DcpS	Scavenger mRNA-Decapping enzyme
DDX5	DEAD Box Protein 5
DDX6	DEAD Box Protein 6
DICE	Differentiation Control Element
DNF	Dégénérescence NeuroFibrillaire
E. Coli	<i>Escherichia Coli</i>
EDC3	Enhancer of mRNA Decapping 3
EDC4	Enhancer of mRNA Decapping 4
eIF4a	Eukaryotic initiation factor-4A
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
FTD	Démence Fronto-Temporale
FTDP-17	Démence Fronto-Temporale et Parkinsonisme liée au chromosome 17
GFP	Green Fluorescent Protein
GPx	Glutathione Peroxidase
GS	Granule de Stress
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase - 3 β
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosine TriPhosphate
HDAC6	Histone Deacetylase 6
IRES	Internal ribosome entry site
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LbN	Peptide Lambda-N
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term Potentiation

MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Microtubules Associated Protein
MAP1A/B	Microtubule Associated Protein 1A/B
MAP2	Microtubule Associated Protein 2
MAPT	Microtubules Associated Protein Tau
MCI	Mild Cognitive Impairment
NCLK	Neuronal Cdc 2-like Kinase
NOR	Organisateurs Nucléolaires
P38MAPK	P38 Mitogen-Activated Protein Kkinases
PABP	Poly(A)-Binding Protein
PABPC	Cytoplasmic Poly(A)-Binding Protein
PAN2/3	Poly(A)-binding protein-dependent poly(A) riboNuclease 2/3
PARN	Poly(A)-Specific Ribonuclease
P-bodies	Processing-bodies
PDPKs	Proline-Directed Protein Kinases
PHF	Paired Helicoidal Fibrils
PKA	Protein Kinase A
P-loop	Phosphate-binding loop
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PP2B	Protein Phosphatase 2B
Pré-risc	Pre-RNA-induced silencing complex
PSD95	PostSynaptic Density Protein 95
PSP	Paralysie Supra-Nucléaire
Récepteurs NMDA	Récepteurs N-méthyl D-Aspartique
Région 3'UTR	Région 3' Non Traduite
REST	RE1-Silencing Transcription factor
RISC	RNA-induced silencing complex
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNase A	Ribonucléase A
ROS	Reactive Oxygene Species
RT-QPCR	Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction
SDH4	Succinate DeHydrogenase 4
SH3	Scr Homology 3
sh-RNA	SmallHairpin-RNA
SiARN	Small InterferentARN
SO	Stress Oxydant
SOD	Superoxide Dismutase
TAP-tag	Tandem Affinity Purification -
TTP	Tristetraprolin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XRN1	5'-3' Exoribonuclease 1

Introduction

Chapitre 1 : Physiologie et Pathologie de la protéine Tau.

A. La physiologie de la protéine Tau

L'histoire de la découverte de la protéine Tau est associée à l'étude du cytosquelette. Le cytosquelette est constitué d'un réseau complexe de filaments et de tubules protéiques impliqué dans une pléiade de fonctions essentielles à la vie cellulaire. Parmi ces éléments, le réseau microtubulaire est constitué de cylindres creux dont l'unité structurale est l'hétérodimère de tubuline. En 1975, à partir de cerveaux de porcs, Weingarten et ses collaborateurs isolent un facteur « essentiel » à la polymérisation des microtubules (Weingarten et al., 1975). Ils nomment ce nouveau venu dans la famille des MAP (« Microtubules Associated Protein ») : Tau. Au cours de ce premier chapitre, nous nous intéresserons au gène de Tau, à la structure, la physiologie et les fonctions connues de cette protéine. En effet, il apparaît que le rôle de Tau ne se limite pas à son interaction avec la tubuline.

I. Du gène à la protéine

La protéine Tau est codée par un gène unique, *MAPT*, « Microtubules Associated Protein Tau ». D'une longueur de 134kb, il est localisé chez l'homme sur le bras long du chromosome 17 en position 17q21 (Neve et al., 1986). La séquence codante prédite est hautement conservée à travers les espèces mammifères. En effet, la séquence protéique de la Tau humaine et murine est identique à 88% (Poorkaj et al., 2001). Chez les primates, la protéine Tau montre une homologie de 98 à 100% avec la Tau humaine (Holzer et al., 2004).

La protéine Tau est principalement exprimée dans les neurones (Avila et al., 2004). Néanmoins, Tau est également détectée, en quantité moindre, dans les cellules gliales (Gorath et al., 2001; Klein et al., 2002; LoPresti et al., 1995; Müller et al., 1997) notamment en condition pathologique (Chin and Goldman, 1996; Ikeda et al., 1995). Concernant les tissus périphériques, la plupart des études ont été menées chez le rat et celles-ci montrent la présence de Tau dans le muscle squelettique, le cœur, le rein, le pancréas et le testicule (Ashman et al., 1992; Gu et al., 1996; Nagao et al., 1999; Vanier et al., 1998). S'agissant de l'Homme, en dépit d'une littérature moins riche, Tau a été décrite en condition physiologique dans le muscle squelettique et le testicule (Sigala et al., 2014; Wei and Andreadis, 1998). Par ailleurs, la protéine Tau est exprimée dans certains cancers tel que le cancer du sein, de la prostate, de

l'ovaire, ou encore de l'estomac (Fekete et al., 2012; Matrone et al., 2010; Souter and Lee, 2009).

1 Les différentes isoformes de la protéine Tau

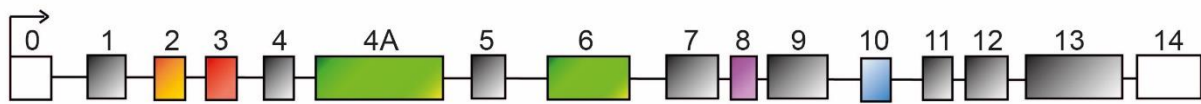
Le transcrit primaire de Tau comporte 16 exons (Andreadis et al., 1992). L'exon 0, associé aux régions promotrices du gène, n'est pas traduit. L'exon 14 fait partie de la région 3' non traduite du transcrit. Il est intéressant de noter que le large exon 4A n'est exprimé que dans les neurones du système nerveux périphérique et code une isoforme de 110kDa : la Big Tau (Boyne et al., 1995). L'inclusion de l'exon 6 peut conduire à l'expression d'une isoforme tronquée à l'extrémité carboxy-terminale (Luo et al., 2004).

Dans le cerveau humain, les exons 4A et 8 sont exclus. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs et les exons 2, 3, 6 et 10 sont alternatifs. Cependant, l'exon 6 est très faiblement exprimé (Wei and Andreadis, 1998). L'exon 3 étant systématiquement transcrit avec l'exon 2, le cerveau humain exprime principalement six isoformes différentes de Tau : 2-3-10-, 2+3-10-, 2+3+10-, 2-3-10+, 2+3-10+, 2+3+10+ (Andreadis et al., 1995). Concernant la nomenclature : on parle d'isoforme 0N en l'absence de l'exon 2 et 3, 1N lorsque l'exon 2 est inclus et 2N quand l'exon 2 et 3 sont inclus. Dans la mesure où l'exon 10 code pour un des 4 domaines pseudo-répété de liaison aux microtubules, on parle de Tau4R lorsque l'exon 10 est inclus et de Tau3R lorsqu'il est exclu (pour revue Caillet-Boudin et al., 2015) (Fig.1).

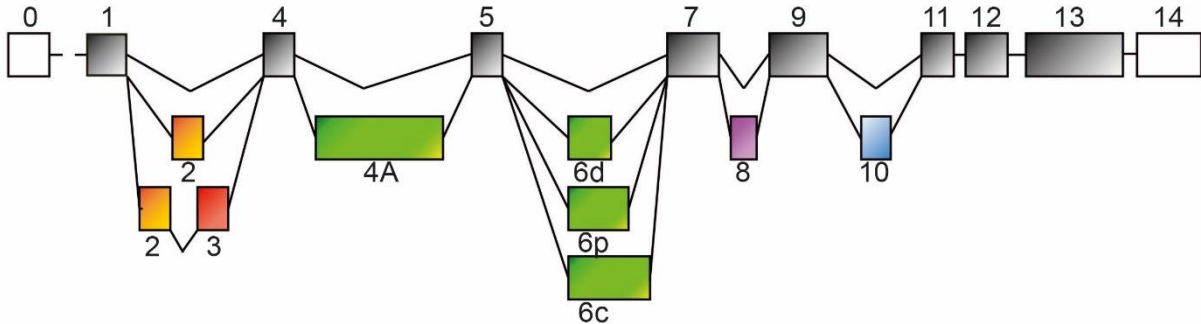
L'expression de ces différentes isoformes est hautement régulée et assujettie à un contrôle temporel. Ainsi, seule l'isoforme la plus courte dite fœtale, 2-3-10-, est présente au cours de l'embryogénèse du cerveau humain (Goedert and Jakes, 1990; Goedert et al., 1989). Le cerveau adulte exprime les 6 isoformes (Avila et al., 2004). Bien que le ratio Tau 4R/Tau3R soit égal à 1, les isoformes 0N, 1N, 2N représentent respectivement 37%, 54%, 9% des protéines Tau totales (Hong et al., 1998).

A l'instar de l'Homme, la souris et le rat n'expriment également que l'isoforme fœtale au stade embryonnaire (Couchie and Nunez, 1985; Kosik et al., 1989). Cependant, à l'âge adulte, les rongeurs n'expriment que les isoformes Tau 4R (Brion et al., 1993). Une exception doit être faite concernant notamment la zone sous-granulaire du gyrus denté, siège de la neurogénèse adulte, où les progéniteurs neuronaux expriment de la Tau3R (Bullmann et al., 2007, 2010).

A Gène MAPT 17q21



B ARNm



C Protéine

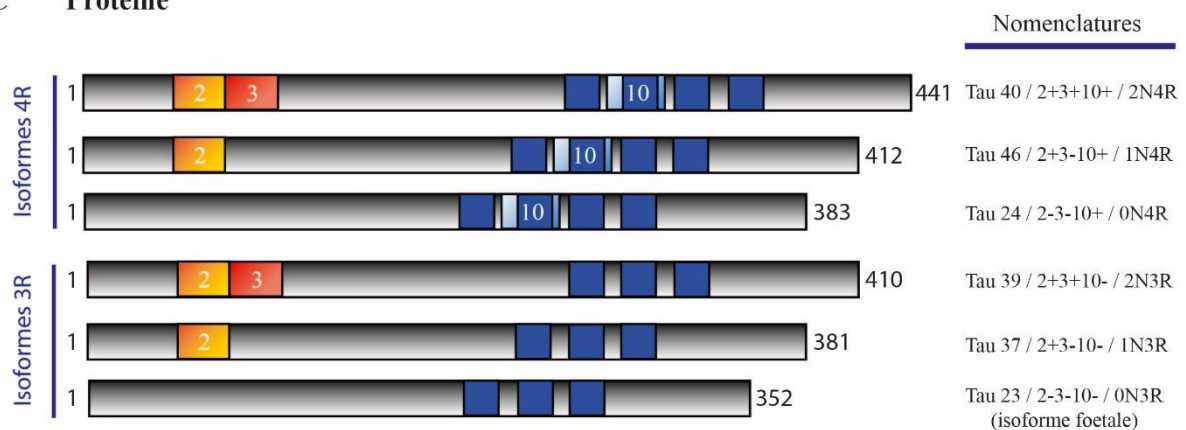


Figure 2 - Du gène MAPT à la protéine Tau. (A) La structure du gène MAPT. (B) Les exons grisés sont constitutifs. Les autres sont soumis à un épissage alternatif. Les exons 4A, 6 et 8 sont transcrits uniquement dans le système nerveux périphérique. (C) Les différentes isoformes de la protéine Tau présentes au sein du système nerveux central humain. L'isoforme foetale correspond à l'isoforme 2-3-10-.

2 Structure de la protéine Tau

Dans le système nerveux central humain, la longueur des isoformes de la protéine Tau varie entre 352 et 441 acides aminés (Fig. 1C).

Traditionnellement, on distingue deux différents domaines d'après le critère d'interaction avec les microtubules : la partie N-terminale dite « domaine de projection » et la partie C-terminale dite « domaine de liaison aux microtubules » (Fig. 2A).

a Le domaine de liaison aux microtubules

Le domaine de liaison aux microtubules est constitué de trois ou quatre séquences pseudo-répétées en fonction de l'inclusion ou non de l'exon 10. Codées respectivement par l'exon 9, 10, 11, 12, chacune de ces séquences est constituée de 18 acides aminés conservés et pseudo-répétés séparées entre elles par des séquences de 12 à 13 acides aminés. De nature basique et chargés positivement, ces domaines interagissent avec la surface des microtubules chargée négativement (Kolarova et al., 2012) (Fig. 2B,C).

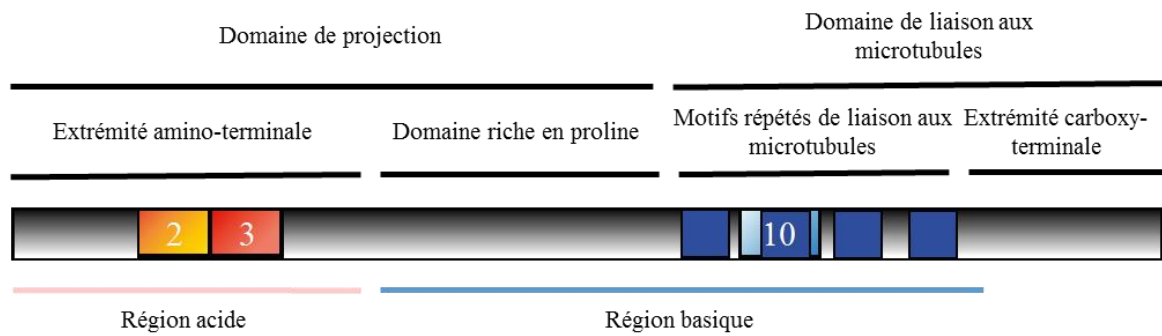
b Le domaine de projection

Dans ce manuscrit, nous appellerons « domaine de projection » la partie N-terminale de la protéine Tau. En son sein, on considère alors deux régions : l'extrémité N-terminale et le domaine riche en proline.

La longueur de l'extrémité N-terminale dépend de l'inclusion de deux séquences de 29 acides aminés codés par l'exon 2 et 3. La composition en acides aminés de cette région lui confère des propriétés biochimiques acides et une charge négative (Fig. 2B,C). En conséquence, lorsque Tau est liée aux microtubules chargés également négativement, l'extrémité N-terminale est repoussée par répulsion électrostatique (Amos et al., 2004). Pour cette raison, on parle de « domaine de projection ». Ce domaine régule ainsi l'espacement entre les microtubules et le diamètre des axones (Chen et al., 1992).

Jouxtant cette région acide, le domaine riche en proline, d'une centaine d'acides aminés se trouve être globalement basique et chargé positivement. Il est caractérisé par la présence de 7 domaines PXXP qui constituent des sites de liaison aux protéines disposant de domaines « Src Homology 3 » (SH3). En outre, ce domaine de projection permet l'interaction avec la membrane plasmique (Brandt et al., 1995).

A

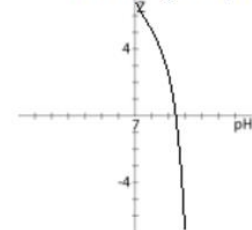


B Propriétés physico-chimiques Tau 46 1N4R

Physiochemical properties

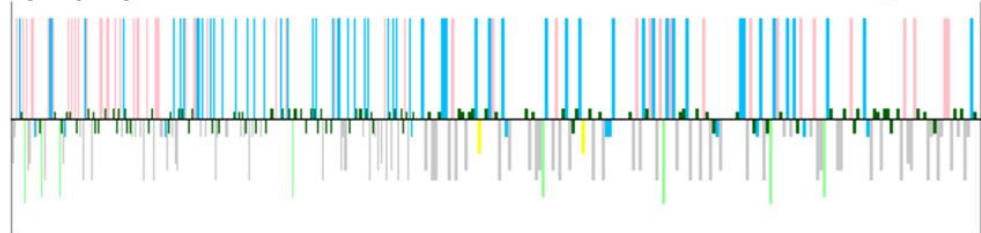
Number of residues:	412
Molecular weight:	42966.3 g/mol
Extinction coefficient:	6400 M ⁻¹ cm ⁻¹
Iso-electric point:	pH 9.45
Net charge at pH 7:	7
Estimated solubility:	Good water solubility.

Net charge vs pH



Hydropathy

Hopp & Woods



Top is hydrophilic
Bottom is hydrophobic
Color codes:

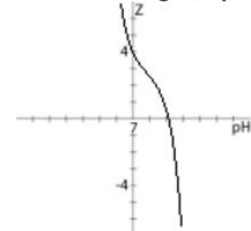
Acidic Aromatic Basic Aliphatic Polar Cysteine

C Propriétés physico-chimiques Tau 37 / 1N3R

Physiochemical properties

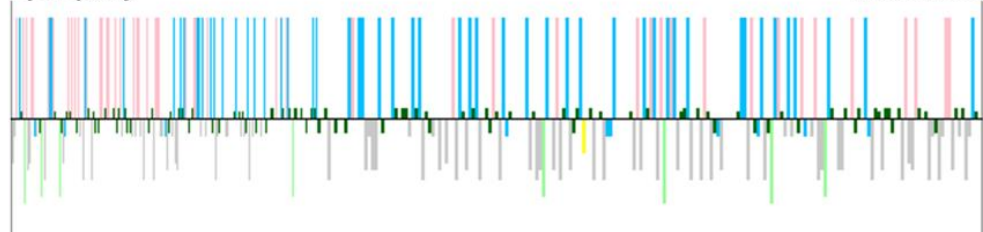
Number of residues:	381
Molecular weight:	39719.6 g/mol
Extinction coefficient:	6400 M ⁻¹ cm ⁻¹
Iso-electric point:	pH 9.13
Net charge at pH 7:	3.9
Estimated solubility:	Good water solubility.

Net charge vs pH



Hydropathy

Hopp & Woods



Top is hydrophilic
Bottom is hydrophobic
Color codes:

Acidic Aromatic Basic Aliphatic Polar Cysteine

Figure 2 – La structure primaire de Tau. (A) Représentation schématique de l'isoforme Tau46 (2+3+10+), la plus longue observée dans le cerveau humain. Le domaine de projection est composé d'une extrémité amino-terminale et d'un domaine riche en proline. Le domaine de liaison aux microtubules est composé de 4 motifs pseudo-répétés impliqués dans la liaison aux microtubules (en bleu) ainsi que d'une extrémité carboxy-terminale. (B-C) Propriétés physico-chimiques de l'isoforme 4R Tau46 (2+3-10+), isoforme la plus exprimée du cerveau ainsi que son équivalent 3R Tau37 (2+3-10-). Données obtenues grâce au Peptide property calculator (InnovagenAB).

3 Aspects conformationnels

En 1977, les travaux de Cleveland *et al.*, mirent en évidence la capacité surprenante de Tau à induire la formation des microtubules dans des conditions dénaturantes (Cleveland *et al.*, 1977a) suggérant une certaine pauvreté de Tau en matière de structures secondaires. À l'image d'autres protéines nativement non conformées (Fig. 3B), Tau contient peu d'acides aminés hydrophobes et est constituée majoritairement d'acides aminés basiques, hydrophiles (Fig. 2). Par voie de conséquence, Tau dispose d'une charge nette positive à pH physiologique et est très soluble dans l'eau. Des méthodes d'études structurales conventionnelles telles que le dichroïsme circulaire ou encore la diffusion de rayons X aux petits angles ont confirmé le caractère flexible, en pelote statistique et l'absence de conformation particulière de Tau (von Bergen *et al.*, 2000; Mukrasch *et al.*, 2009; Schweers *et al.*, 1994) (Fig. 3B). Or, des modèles bio-informatiques prédictifs ont permis de reconsidérer l'existence de quelques potentielles structures secondaires (Gamblin, 2005). La Résonnance Magnétique Nucléaire a pu mettre en lumière un comportement conformationnel dynamique de la protéine Tau en solution. Ainsi, en dépit d'une structure majoritairement non conformée, quelques courtes structures secondaires localisées et transitoires telles que des hélices alpha, des feuilletts beta et des hélices polyproline de type II ont pu être mises en évidence (Mukrasch *et al.*, 2009) (Fig. 3A). En parallèle, la découverte d'anticorps conformationnels de Tau dont l'épitope est constitué d'acides aminés situés en N-terminal et C-terminal a suggéré une réalité conformationnelle (Jicha *et al.*, 1997). Par « fluorescence resonance energy transfer » (FRET), il a été confirmé que Tau adopte un repliement en trombone dans lequel les extrémités C-terminales et N-terminales sont contiguës (Jeganathan *et al.*, 2006).

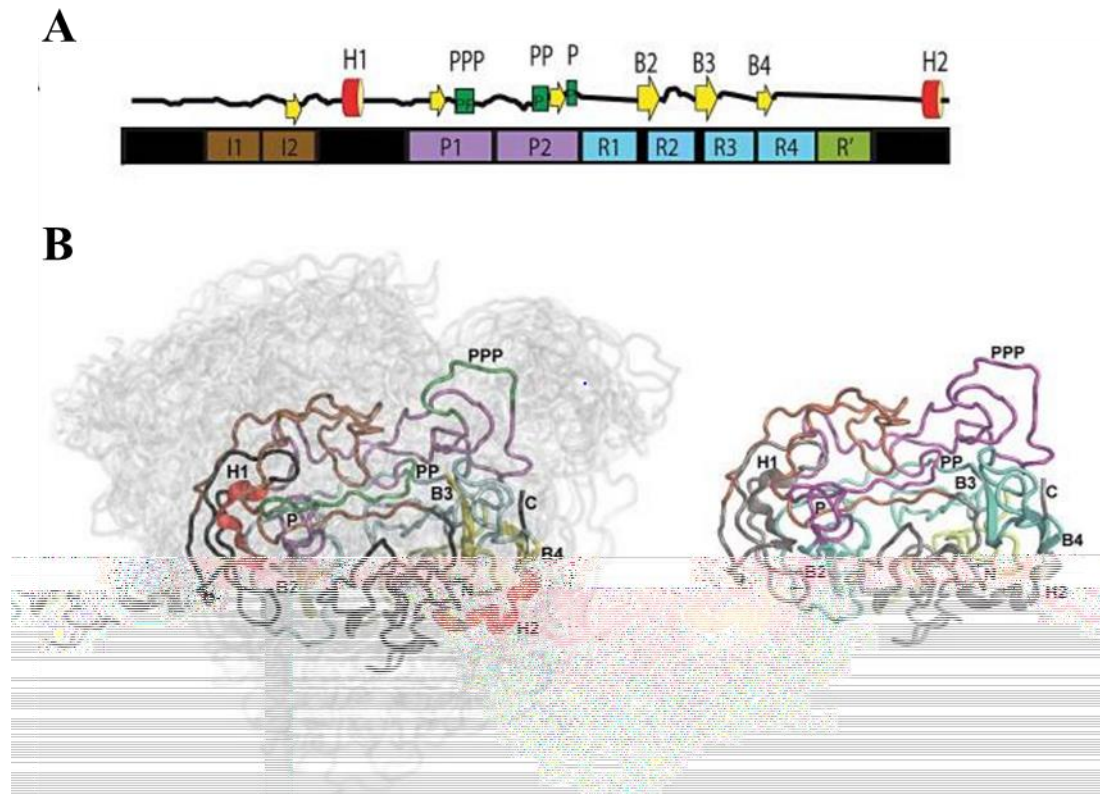


Figure 3 – Conformation de la protéine Tau40 (2+3+10+) à l'état natif en solution révélée par Résonance Magnétique Nucléaire. (A) Représentation linéaire des structures secondaires de la protéine Tau. Principalement non conformée, elle présente des structures secondaires transitoires (les cylindres rouges correspondent aux hélices α , les flèches jaunes aux feuillets β , les carrés verts aux hélices polyproline). (B) Tau est une protéine flexible, très dynamique en solution. Schéma représentant 20 conformations probables de Tau en solution (adapté de Mukrasch et al., 2009).

A contre-courant du paradigme structure-fonction, l'absence de conformation tridimensionnelle de la protéine Tau native laisse supposer de l'importance de ses partenaires ainsi que des modifications post-traductionnelles dans la régulation de sa physiologie. Son caractère métamorphique, sensible à son environnement moléculaire offre des perspectives séduisantes quant à l'étude des fonctions relatives à la multiplicité potentielle de ses partenaires.

II. Localisation et fonctions

A l'origine, Tau fut identifiée comme une protéine axonale associée aux microtubules. En conséquence, les recherches autour de la physiologie et de la pathologie Tau furent centrées sur cette interaction. Cependant, il apparaît que la protéine Tau est présente dans d'autres

compartiments sub-cellulaires, tel que le compartiment somato-dendritique et le noyau suggérant d'autres fonctionnalités que la stabilisation du réseau microtubulaire.

1 Tau est une protéine cytosolique

a Tau et le cytosquelette

Les neurones sont des cellules très organisées, hautement différenciées, arborant des neurites ; axone et dendrites, dont l'architecture et l'orientation sont complexes et ordonnées. La longueur d'un axone peut atteindre un mètre. Dans ce contexte, le cytosquelette est un élément essentiel à la fonctionnalité du neurone.

Les microtubules sont formés d'hétérodimères de tubuline composés d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité beta. Ces hétérodimères sont joints bout à bout pour former un filament linéaire : le proto-filament. Treize proto-filaments sont associés pour assembler un cylindre creux ou microtubule. La polymérisation du proto-filament est régie selon un sens précis. En effet, les dimères ont toujours la même orientation. En conséquence, le microtubule est polarisé. Une extrémité ne présente que des sous-unité alpha tandis que l'autre extrémité n'arbore que des sous-unité beta. Elles sont dites respectivement – et +. Les microtubules sont des structures dynamiques et instables (Mitchison and Kirschner, 1984). A l'image d'un tapis-roulant, l'extrémité + croît tandis que l'extrémité – se raccourcit.

La stabilité et la polymérisation des microtubules sont notamment régulées par leur interaction avec les protéines MAP. Parmi elles, Tau se lie à l'interface alpha tubuline – beta tubuline des hétérodimères au travers de ses quatre domaines pseudo-répétés de liaison aux microtubules (Kadavath et al., 2015). De par cette interaction, Tau stabilise et promeut la polymérisation des microtubules (Cleveland et al., 1977a; Drechsel et al., 1992; Trinczek et al., 1995) (Fig. 4). Les isoformes 4R de Tau présentent une affinité supérieure envers les microtubules que les isoformes 3R (Goode and Feinstein, 1994). Ainsi, les isoformes 4R stabilisent et stimulent davantage la polymérisation des microtubules que leurs équivalents 3R (Goedert and Jakes, 1990, Panda et al., 2003).

En outre, Tau connecterait les microtubules aux autres éléments du cytosquelette *via* notamment son interaction avec l'actine (He et al., 2009; Yu and Rasenick, 2006).

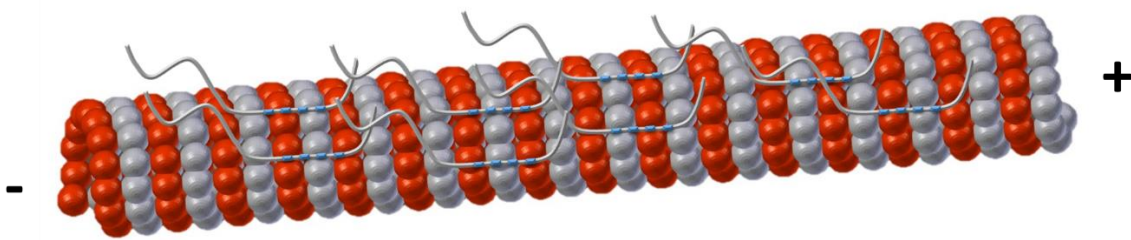


Figure 4 – Tau se lie aux microtubules, stabilise et promeut la dynamique microtubulaire. Via ses domaines de liaison aux microtubules (boîtes bleues), Tau se lie aux hétérodimères de tubuline qui composent le microtubule. Les proportions, tailles des protéines ne sont pas respectées.

b Tau et transport axonal

Les protéines motrices utilisent les microtubules à l'image de rails le long desquels elles transportent des cargos, vésicules ou organites. Parmi ces protéines motrices, la dynéine et la kinésine sont respectivement impliquées dans le transport rétrograde et antérograde. Le transport antérograde correspond au déplacement de ces structures du pôle négatif du microtubule vers le pôle positif. Par opposition, le transport rétrograde se déroule dans le sens inverse. Au sein de l'axone, le pôle négatif se situe au niveau du compartiment somato-dendritique tandis que le pôle positif se situe dans la partie distale de l'axone.

La surexpression de Tau inhibe le transport des vésicules et des mitochondries (Ebner et al., 1998; Stamer et al., 2002) suggérant une régulation du transport axonal par la protéine Tau (Fig. 5). Tau interagit avec le complexe dynéine-dynactine et la kinésine (Magnani et al., 2007; Utton et al., 2005). En particulier, *via* sa partie N-terminale, Tau active la liaison de la dynactine aux microtubules (Magnani et al., 2007). Un phénomène de compétition pour la liaison aux microtubules entre Tau et ces protéines motrices régule la quantité de ces protéines mobiles sur les microtubules (Dixit et al., 2008). *In vitro*, il a été montré que Tau régule le nombre de kinésines engagées sur les microtubules et que cette propriété dépend de l'isoforme de Tau considérée (Vershini et al., 2007). Physiologiquement, Tau est distribué le long de des microtubules axonaux selon un gradient de concentration (Black et al., 1996; Kempf et al., 1996). Ce gradient faciliterait le transport antérograde. En effet, une faible concentration de Tau dans la partie proximale de l'axone activerait la liaison de la kinésine aux microtubules tandis qu'une forte concentration de Tau dans la partie distale induirait la séparation de la kinésine du microtubule et le relargage du cargo (Dixit et al., 2008).

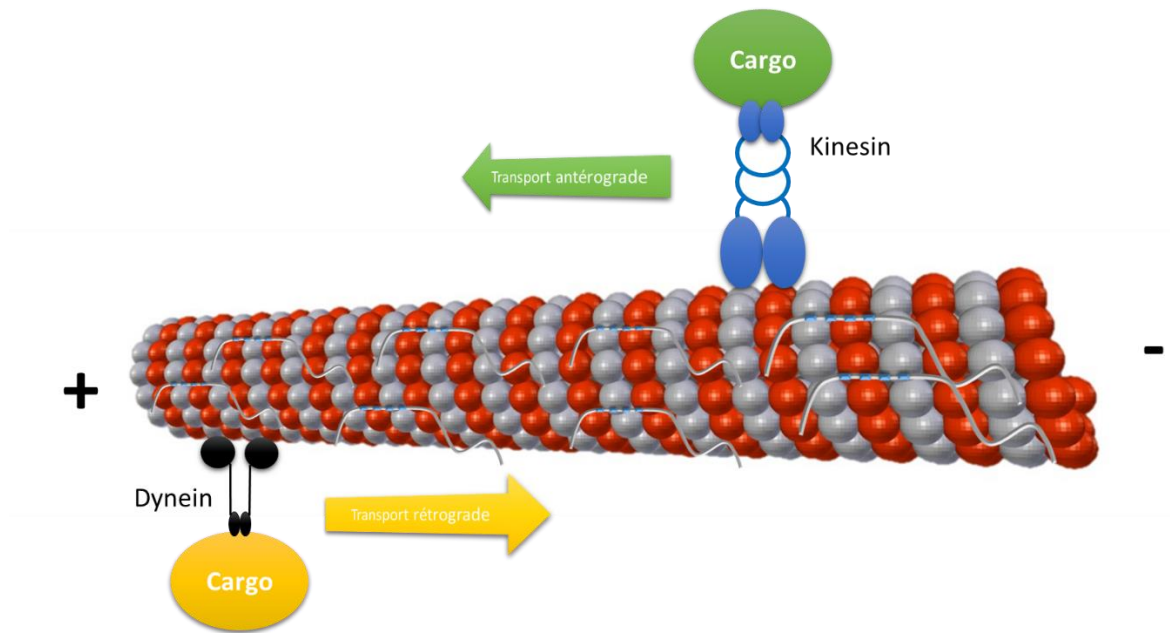


Figure 5 – Tau participe au transport axonal. Tau interagit avec le complexe dynéine-dynactine et la kinésine, participant ainsi respectivement au transport rétrograde et antérograde.

c Tau, neurogénèse et croissance neuritique

Le réseau des microtubules joue un rôle important dans la croissance neuritique des neurones en cours de différenciation. De par son implication dans la dynamique microtubulaire, Tau intervient lors de ces processus biologiques. En effet, l'addition d'oligonucléotides anti-sens ciblant Tau dans des cultures primaires de neurones de rats inhibe la croissance des neurites (Caceres and Kosik, 1990). Ce résultat a pu être confirmé par des méthodes d'inactivation laser assistées par des chromophores ciblant Tau (Liu et al., 1999). Les neurones issus de cultures primaires de souris déficientes pour la protéine Tau, présentent un retard de croissance des neurites (Dawson et al., 2001). En outre, lorsque Tau est sur-exprimée, elle promeut la croissance neuritique dans des cellules non-neuronales et de neuroblastome murin (Knops et al., 1991; Yoshizaki et al., 2004).

In vivo, au cours de l'embryogénèse, les neurones n'expriment que l'isoforme Tau3R la plus courte : l'isoforme fœtale. Cette curiosité s'expliquerait par les propriétés stabilisatrices moindre de cette isoforme vis-à-vis des microtubules. En effet, les contraintes inhérentes au développement et à la migration des progéniteurs neuronaux nécessiteraient un cytosquelette dynamique et plastique (Fuster-Matanzo et al., 2012). Chez le rat, on observe ainsi une diminution de la proportion d'isoforme Tau 3R au profit des isoformes Tau 4R au cours du développement *in vivo* (Bullmann et al., 2009). Ainsi, les neurones murins différenciés

n'expriment que Tau 4R. Cependant, l'expression de l'isoforme fœtale 3R persiste parmi les neurones engagés dans la neurogénèse adulte au sein de la couche sous granulaire du gyrus denté (Bullmann et al., 2007; McMillan et al., 2008). Cette expression de l'isoforme Tau3R dans les neurones immatures a pu être mise en évidence après l'administration de Bromodésoxyuridine (BrdU). En effet, cet analogue de la thymidine s'incorpore dans l'ADN des cellules en mitose. Ces neurones immatures ainsi marqués expriment l'isoforme Tau 3R (Bullman et al., 2007). Ces résultats sont confirmés par l'injection de rétrovirus codant la « Green Fluorescent Protein » (GFP) au niveau de l'hippocampe. Ne s'intégrant qu'au sein des cellules en division, cette méthode permet de marquer les neurones nouvellement formés. Or, ces neurones immatures marqués par la GFP expriment l'isoforme Tau 3R (Llorens-Martin et al., 2012). Dans le but d'étudier le rôle de Tau dans la neurogénèse, le phénotype de souris KO-Tau a été analysé. L'observation du nombre de neurones hippocampiques positifs pour la doublecortine, marqueur des neurones immatures, ne révèle aucune différence entre les KO Tau et les souris sauvages au sein du gyrus denté. Cependant, les auteurs montrent une diminution importante de la migration neuronale chez ces souris déficientes en Tau (Fuster-Matanzo et al., 2009). En effet, la réduction de l'expression de Tau, par stratégie sh-ARN, altère la migration neuronale dans des embryons de souris (Sapir et al., 2012). Cependant des disparités existent parmi les modèles de souris déficientes en Tau. En effet, Hong et ses collaborateurs mettent en évidence, quant à eux, une sévère diminution du nombre de neurones immatures au sein du gyrus denté chez une autre lignée de souris KO Tau (Hong et al., 2010). Dans un modèle de souris Tau-KnockOut/KnockIn n'exprimant que la Tau humaine 4R, une augmentation significative du nombre de neurones hippocampiques a pu être décrite. Cette augmentation résulte d'une stimulation de la neurogénèse et de la survie cellulaire. Dans des cultures primaires de neurones hippocampiques hTau4R-KOKI, l'expression de Tau induit la différenciation des progéniteurs neuronaux et promeut la croissance neuritique. De manière intéressante, la transfection de Tau3R dans ces cultures active la prolifération des progéniteurs et inhibe la différenciation de ces derniers. Ce point met en lumière un potentiel mécanisme de régulation de la neurogénèse par l'épissage alternatif de Tau (Sennvik et al., 2007).

Face à ces disparités parmi les modèles de souris déficientes en Tau, une étude menée par l'équipe de J. Avilla a récemment pointé l'importance du contexte environnemental. Celle-ci met en évidence l'implication de Tau dans la neurogénèse hippocampique adulte en particulier sous l'effet de stimuli externes. Ainsi l'absence de Tau prévient l'effet délétère du stress sur la survie des neurones nouvellement différenciés mais diminue également l'effet

positif de l'enrichissement environnemental sur la neurogénèse. Par ailleurs, les auteurs montrent l'implication de Tau dans la maturation des synapses. La déficience en Tau altère la morphologie des épines dendritiques ainsi que des densités post-synaptiques (Pallas-Bazarra et al., 2016).

Au-delà de la controverse autour du rôle de Tau dans la neurogénèse, ces travaux présentent une résonance particulière quant à la relation de Tau avec la synapse.

d Tau, signalisation cellulaire et plasticité synaptique

En 1995, Brandt et collaborateurs rapportent la présence de Tau à la membrane plasmique et une probable implication de l'extrémité N-terminale dans cette localisation (Brandt et al., 1995). Par l'intermédiaire de son domaine riche en proline, Tau interagit avec le domaine SH3 de protéines associées à la membrane et impliquées dans la signalisation cellulaire telles que Fyn ou phosphatidylinositol 3-kinase (Lee et al., 1998; Reynolds et al., 2008). Ces données suggèrent un rôle de Tau dans ces voies de signalisation cellulaire. En 2010, Ittner et collaborateurs mettent en évidence que Tau régule la distribution de Fyn dans l'élément post-synaptique (Ittner et al., 2010). Tau interagit également avec PSD95 (Mondragón-Rodríguez et al., 2012). Au sein de la synapse, les kinases Fyn et PSD95 régulent l'activité des récepteurs NMDA impliqués dans la plasticité synaptique (Hunt and Castillo, 2012). De manière intéressante, l'activité synaptique induit la translocation de Tau au sein de ce compartiment synaptique (Frandemiche et al., 2014).

Cette plasticité synaptique, élément fondamental des processus mnésiques, est notamment assurée par les phénomènes de potentialisation et dépression à long-terme de la synapse. Or, les modèles murins déficientes en Tau présentent une altération de ces processus suggérant un rôle important de Tau dans les mécanismes de la mémoire (Ahmed et al., 2014; Kimura et al., 2013).

2 Tau est une protéine nucléaire

Initialement, Tau fut décrite comme une protéine cytosolique. Cependant, il apparaît de plus en plus clairement que Tau joue un rôle important dans le compartiment nucléaire.

a Localisation de Tau dans le noyau des cellules

Quinze années après la découverte de Tau, l'équipe de Lester Binder décrit pour la première fois une localisation nucléaire de Tau dans des cellules de neuroblastome humain (Loomis et al., 1990). Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence la présence de Tau au niveau de l'organisateur nucléolaire. Cette localisation a ensuite été confirmée dans d'autres lignées cellulaires de neuroblastomes de primates et murines (Greenwood and Johnson, 1995; Thurston et al., 1997; Wang et al., 1993) ainsi que dans des lignées non-neurales (Cross et al., 2000; Sjöberg et al., 2006; Thurston et al., 1996).

Par ailleurs, l'existence de protéines Tau nucléaires dans un contexte physiologique plus pertinent a été investigué. Ainsi, la présence de Tau nucléaire est démontrée dans des cultures primaires de neurones corticaux de souris (Sultan et al., 2011) et dans le cerveau de souris (Liu and Götz, 2013; Violet et al., 2014). Concernant l'Homme, la localisation nucléaire de Tau est également attestée (Brady et al., 1995).

S'agissant de la nature de la protéine Tau nucléaire, la littérature reste obscure. Cependant, une étude a souligné, par fractionnement subcellulaire et immunohistochimie, la présence des isoformes 0N, 1N et 2N dans le noyau de neurones de cerveaux de souris. Elle révèle que l'isoforme 1N serait particulièrement enrichie dans le noyau (Liu et al., 2013).

b Interaction de Tau avec les acides nucléiques

Au regard de la localisation atypique de cette MAP dans le compartiment nucléaire, la question de l'interaction de Tau avec l'ADN s'est posée. Dès 1978, Corces et al., ont montré que des MAP, sans toutefois les identifier, interagissent avec l'ADN. Ce même groupe mit ensuite en évidence que la présence d'ADN inhibe la polymérisation des microtubules. Cette étude suggère que ces MAP, parmi lesquelles figure Tau, lie l'ADN avec une affinité supérieure à celle qu'elles ont pour la tubuline (Corces et al., 1980). Des expériences menées *in vitro* montre que Tau stabilise la structure en double hélice de l'ADN. L'interaction de Tau avec l'ADN est confirmée par des méthodes de chromatographie d'affinité et de retard sur gel (Hua and He, 2002). Cependant, la nature de l'interaction entre Tau et l'ADN reste obscure. En effet, des études montrent une interaction réversible de Tau avec l'ADN double-brin de manière séquence non-spécifique et réversible (Camero et al., 2014a; Hua et al., 2003) tandis que d'autres travaux indiquent que Tau est également capable d'interagir avec l'ADN simple-brin

de façon séquence spécifique (Krylova et al., 2005). De manière intéressante, Tau modulerait la conformation tridimensionnelle de l'ADN (Qu et al., 2004; Vasudevaraju et al., 2012).

Tau interagit, par l'intermédiaire de son domaine riche en proline et de ses domaines de liaisons aux microtubules, avec le petit sillon de l'ADN (Wei et al., 2008). De manière particulièrement intéressante, à l'image des histones, l'interaction de Tau à l'ADN rappelle celui d'un collier de perle (Camero et al., 2014b). Récemment, par Résonance Magnétique Nucléaire, l'identification des sites d'interactions de Tau vis-à-vis de l'ADN a pu être affinée : il s'agit de la seconde moitié du domaine riche en proline et du deuxième domaine de liaison aux microtubules codé par l'exon 10 (Qi et al., 2015).

Sans toutefois démontrer une interaction directe, des études *in cellulo* ont pu confirmer une réalité cellulaire à ces expériences menées *in vitro*. Le fractionnement sub-cellulaire de cellules de neuroblastomes LA-N-5 a permis de montrer la présence de Tau dans la fraction chromatinienne (Greenwood and Johnson, 1995). Dans des cellules HeLa et des fibroblastes, il a été mis en évidence une co-localisation entre Tau et l'ADN satellite péricentromérique par microscopie confocale. *In vitro*, les auteurs ont validé la liaison de Tau aux séquences d'ADN satellite péricentromérique riche en adénosine et thymine (Sjöberg et al., 2006). Dans un contexte neuronal, au sein de cultures primaires de neurones murins, l'interaction entre Tau et l'ADN, notamment l'hétérochromatine péricentromérique, a pu être mis en évidence par immunoprécipitation de la chromatine (Mansuroglu et al., 2016; Sultan et al., 2011). De surcroît, la liaison de Tau au petit sillon de l'ADN riche en adénosine et thymine a pu être confirmé dans ce modèle *in vitro* (Sultan et al., 2011).

c Fonction de la protéine Tau nucléaire

La localisation atypique d'une MAP dans le noyau soulève des interrogations intéressantes. S'agit-il d'un confinement spatial assurant un niveau complémentaire de régulation de ses fonctions cytosoliques ou porte-t-elle une fonctionnalité nucléaire ? Un nombre croissant d'études tend à montrer que Tau joue un rôle central dans des processus nucléaires.

i. Un rôle nucléolaire ?

Le nucléole est un sous-compartiment nucléaire où sont transcrits les ARN ribosomiques. La présence de Tau est attestée dans le nucléole, notamment au sein de l'organisateur nucléolaire (Thurston et al., 1996). Des méthodes d'ARN interférence ciblant Tau montrent que l'absence de Tau n'altère pas la morphologie du nucléole excluant de prime abord l'hypothèse d'une implication dans la formation et la structure du nucléole (Thurston et al., 1997). Les organisateurs nucléolaires (NOR) sont des régions chromosomiques contenant les gènes codants pour les ARN ribosomiques. Ces gènes sont localisés à proximité directe de l'hétérochromatine péricentromérique. Tau interagit avec les séquences d'ADN satellites composant cette hétérochromatine péricentromérique. De plus, Tau co-localise en périphérie du nucléole avec la marque épigénétique diméthyl H3K9, caractéristique de l'hétérochromatine. Ces résultats suggèrent un potentiel rôle de Tau dans la régulation de l'hétérochromatine périnucléolaire (Sjöberg et al., 2006). La présence de Tau au niveau du composant fibrillaire dense, zone de transcription des gènes codant les ARN ribosomiques enrichie le champ des hypothèses avec une potentielle implication de Tau dans le processing de ces ARN (Thurston et al., 1997).

ii. Tau régulateur transcriptionnel ?

De par son interaction avec l'ADN, l'éventualité d'une protéine Tau régulatrice de l'expression génique a émergé. Cette hypothèse est appuyée par la capacité de Tau à induire des modifications de la conformation de l'ADN (Padmaraju et al., 2010; Qu et al., 2004). Des approches transcriptomiques par micro-arrays ont été réalisées à partir de lysats de cerveaux ou d'hippocampes de souris sauvages et de souris KO-Tau. Parmi les nombreux gènes identifiés comme dérégulés, l'expression de quatorze d'entre eux ont été confirmés par RT-QPCR (de Barreda et al., 2010; Oyama et al., 2004). Au sein de ces gènes dont l'expression est dérégulée en l'absence de Tau, BAF57 est particulièrement intéressant. En effet, BAF57 est une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF et un activateur du répresseur transcriptionnel REST. Ainsi BAF57 pourrait être un levier potentiel sur lequel agirait Tau pour moduler l'expression génique. De plus, Tau interagit avec la protéine Histone Déacétylase 6 (HDAC6) (Ding et al., 2008; Perez et al., 2009). Cette protéine désacétyle les histones, modifie la structure de la chromatine et, in fine, altère l'expression génique. Or, des travaux menés par

Perez et collaborateurs mettent en évidence une diminution de l'acétylation de la tubuline dans des cultures primaires de neurones de souris KO Tau suggérant une action régulatrice de Tau vis-à-vis de l'acétylation. Ces résultats sont confirmés par des expériences menées *in vitro* dans lesquelles les auteurs montrent que Tau inhibe l'activité déacétylase de HDAC6 (Perez et al., 2009). En conséquence, cette étude ouvre l'hypothèse que Tau pourrait moduler l'expression génique à travers des mécanismes épigénétiques.

iii. Tau protecteur des acides nucléiques.

Des travaux menés *in vitro* ont cherché à identifier la fonction associée à l'interaction de Tau avec l'ADN. Ainsi, il a pu être mis en évidence que Tau stabilise la double hélice de l'ADN, le protégeant de la dénaturation thermique et facilitant sa renaturation (Hua and He, 2003). Le stress oxydatif est une des principales causes de dommages à l'ADN (Wiseman and Halliwell, 1996), particulièrement dans le cerveau compte-tenu de l'importante consommation d'oxygène par les neurones. Ce stress oxydatif génère différents types de lésions tels que des adduits, des coupures ou des dommages de types cross-link. L'ensemble de ces dommages peut compromettre la viabilité cellulaire (Klaunig et al., 2010). Des équipes ont ainsi investigués l'effet d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sur l'intégrité de l'ADN en présence de Tau. *In vitro*, des études ont mis en évidence la capacité de Tau à prévenir les dommages induits par les ROS sur l'ADN (Lu et al., 2013b; Wei et al., 2008). Au sein du laboratoire, notre équipe a montré, dans des cultures primaires de neurones corticaux murins sauvages, qu'un stress hyperthermique, outil inducteur de stress oxydant, provoque la translocation de Tau au noyau et augmente sa capacité à interagir avec l'ADN. De plus, au sein de culture primaire KO Tau, le stress hyperthermique induit des dommages à l'ADN. Ces dommages sont prévenus lorsque Tau est sur-exprimée par stratégie adénovirale dans ces cellules (Sultan et al., 2011). Plus récemment, le rôle protecteur de Tau vis-à-vis de l'ADN a été confirmé *in vivo* chez la souris. Comparativement aux souris sauvages, les souris KO Tau présentent une augmentation des dommages à l'ADN et aux ARN en condition physiologique et de stress oxydant (Violet et al., 2014). L'ensemble de ces études mettent en lumière le rôle de Tau dans la protection de l'intégrité des acides nucléiques. A ce jour, la mécanique moléculaire de cette fonction protectrice reste obscure. A contre-pied d'un rôle protecteur de Tau vis-à-vis de l'ADN, Padmaraju *et al.* ont mis en évidence que la liaison de Tau à l'ADN modifie sa conformation et le rend plus vulnérable à une digestion par la DNase I (Padmaraju et al., 2010). Cependant, une

régulation de la conformation de l'ADN par Tau, une protection physique de Tau sur l'ADN ou encore l'existence de partenaires de Tau impliqués dans la régulation de l'intégrité des acides nucléiques forment des hypothèses intéressantes et non-exclusives.

3 Une fonction extra-cellulaire de Tau ?

En dépit d'une localisation principalement intracellulaire, un nombre croissant d'études montre une présence physiologique de Tau dans l'espace extra-cellulaire dans des cultures cellulaires (Chai et al., 2012; Karch et al., 2012; Pooler et al., 2013) ainsi qu'*in vivo* (Yamada et al., 2011). Fait intéressant, l'activité neuronale active la sécrétion de Tau (Pooler et al., 2013; Yamada et al., 2014). Les mécanismes impliqués dans cette sécrétion restent méconnus. Dans le cerveau humain, Tau co-localise avec K-DEL et Golgin97, deux marqueurs respectifs du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, suggérant une potentielle implication de ces structures dans la sécrétion de Tau (Tang et al., 2015). Pourtant l'inhibition de cette voie de sécrétion ne diminue pas la quantité de Tau dans le compartiment extracellulaire (Chai et al., 2012; Karch et al., 2012). Cette sécrétion impliquerait des voies non-conventionnelles vésiculaires ou non, indépendantes de la voie Reticulum Endoplasmique/Golgi. A ce titre, des données indiquent la présence de Tau dans le milieu extra-cellulaire au sein d'exosomes, d'ectosomes (Dujardin et al., 2014; Simón et al., 2012) ainsi que sous forme libre (Chai et al., 2012).

La fonction physiologique de cette Tau sécrétée est inconnue. L'équipe de J. Avila ont émis l'hypothèse d'un mécanisme assurant l'homéostasie, préservant la cellule de toute toxicité induite par une sur-expression de Tau (Simón et al., 2012). Tau pourrait également jouer un rôle dans la signalisation cellulaire. En effet, la protéine Tau interagit avec les récepteurs muscariniques M1 et M3, augmentant ainsi la concentration de calcium intracellulaire dans des cultures de neurones (Gómez-Ramos et al., 2008, 2009).

4 Tau, une protéine impliquée dans le métabolisme des ARN ?

En 1975, Bryan et collaborateurs montrent qu'à l'instar de l'ADN, l'ARN inhibe la polymérisation des microtubules *in vitro*. Les auteurs montrent que cette inhibition résulte d'une interaction entre l'ARN et un facteur basique activateur de la polymérisation des microtubules. Contemporains des travaux de l'équipe de Kirschner, ils proposent la protéine Tau (Bryan et

al., 1975). L'utilisation de protéine Tau recombinante a permis la confirmation de l'implication de Tau dans l'inhibition de la polymérisation des microtubules en présence d'ARN (Kampers et al., 1996; Wang et al., 2006b). Par chromatographie d'affinité, microscopie à force atomique et retard sur gel, la réalité d'une interaction entre Tau et l'ARN a pu être mise en évidence et partiellement caractérisée. En effet, Tau interagit de manière non-spécifique aux ARN messagers, ribosomaux ou de transfert, qu'ils soient simple ou double-brin. Cette interaction est de nature électrostatique et implique le domaine riche en proline et de liaison aux microtubules de Tau. Dans un contexte cellulaire, au sein de cellules de neuroblastomes humain SH-SY5Y, Tau co-localise avec l'ARN dans le noyau et le cytoplasme (Wang et al., 2006b). Au cours de ce travail de thèse, Gunawardana et collaborateurs ont généré le premier inventaire approfondi de l'interactome de la protéine Tau. Il ressort de cette étude une association saisissante de Tau avec le ribonucléoprotéome, en particulier des protéines impliquées dans la traduction et le processing des ARN (Gunawardana et al., 2015). D'ailleurs, dès 1987, une co-localisation de Tau avec les ribosomes a été mise en évidence (Papazomenos and Binder, 1987). Pourtant, peu d'études ont été menées afin de comprendre la signification fonctionnelle de ces interactions, excepté dans un contexte pathologique (Meier et al., 2016; Papasozomenos, 1989). Récemment, une étude a mis en évidence l'interaction de Tau avec TIA1 et DDX5, deux protéines de liaison à l'ARN impliquées dans les granules de stress. Ceux-ci correspondent à de denses foci cytoplasmiques composés de protéines et d'ARN messagers dont la formation est induite par un stress cellulaire. Ce travail a mis en lumière un rôle physiologique de Tau dans la formation de ces granules de stress (Vanderweyde et al., 2016). Nous discuterons brièvement de ces structures dans le chapitre 2.IV.

En tout état de cause, Tau est une protéine multifonctionnelle. A ce titre, elle nécessite une régulation fine au travers de nombreuses régulations post-traductionnelles.

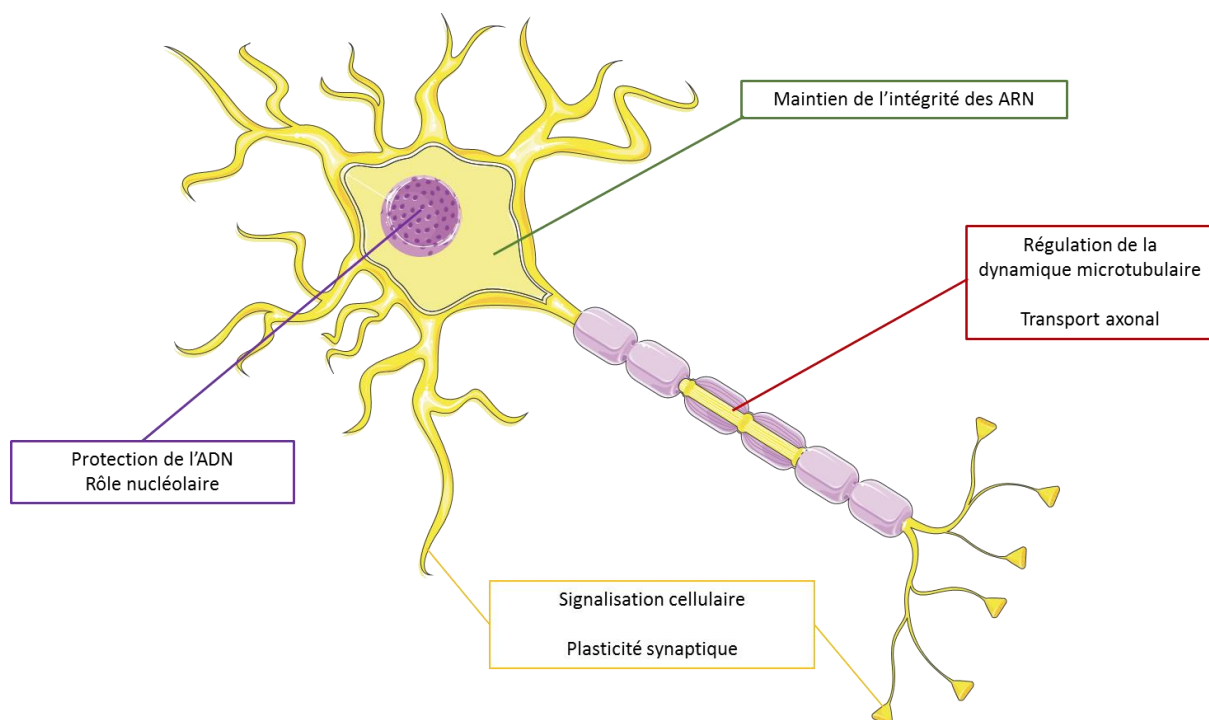


Figure 6 – Schéma récapitulatif des fonctions physiologiques de la protéine Tau. Tau n'est pas localisée uniquement au niveau des microtubules axonaux. Elle est localisée également au niveau nucléaire, où elle protège l'intégrité de l'ADN. Elle est présente au niveau de la membrane plasmique où elle est impliquée dans la signalisation cellulaire et la plasticité synaptique. Dans le cytoplasme, Tau pourrait jouer un rôle dans le métabolisme des ARN.

III. Régulation de la fonction de Tau par des modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles désignent les différents processus par lesquels une protéine va être modifiée chimiquement à l'issue de sa synthèse ou au cours de sa vie cellulaire. Ces modifications régulent sa fonction, entraînent une variation de sa demi-vie ou influent sur sa localisation cellulaire.

La protéine Tau est la cible d'une large gamme de modifications post-traductionnelles. Parmi elles, la phosphorylation est la plus étudiée. En effet, Tau possède 85 sites de phosphorylation probables sur les 441 acides aminés de sa forme longue soit environ 20% de résidus phosphorylables. A ce titre, la phosphorylation revêt une importance cruciale dans la physiologie de Tau.

Dans cette section, nous nous intéresserons donc particulièrement à la phosphorylation avant d'évoquer brièvement d'autres modifications post-traductionnelles ciblant Tau.

1 La phosphorylation de Tau

La phosphorylation consiste en l'ajout d'un groupement phosphate fourni par une molécule d'ATP à un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. La réaction est catalysée par les kinases qui transfèrent le groupement phosphate sur le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de ces acides aminés. La déphosphorylation est assurée par les phosphatases. Ces réactions sont réversibles et dynamiques. Ainsi, le niveau de phosphorylation de Tau dépend d'un équilibre entre l'activité des kinases et des phosphatases.

Des 85 sites de phosphorylations putatifs de Tau, on distingue 45 sérines, 30 thréonines et 5 tyrosines. Parmi ces acides aminés, la phosphorylation physiologique de neuf d'entre eux a pu être observé dans des cerveaux humains post-mortem (Hanger et al., 2007).

a Les kinases

Tau est la cible d'une vingtaine de kinases différentes. Celles-ci sont réparties en trois familles selon leur motif de reconnaissance. Ainsi on distingue les kinases « proline-directed protein kinases » (PDPKs) qui phosphorylent les sérines ou les thréonines situées après un résidu proline. Les principales PDPKs sont la glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) et la cyclin-dependent-like kinase-5 (CDK5). Parmi celles qui phosphorylent les sérines ou les thréonines non suivies d'un résidu proline (non-PDPKs), il y a notamment la calcium/calmodulin-activated protein kinase II (CaMKII), la protein kinase A (PKA) et la casein kinase 1 (CK1). Enfin, le dernier groupe est composé de kinases spécifiques des tyrosines tel que Fyn.

b Les phosphatases

La déphosphorylation de Tau est assurée par différentes phosphatases telles que « Protein Phosphatase 1 » (PP1), PP2A, PP2B (Liu et al., 2005). A elle seule, PP2A est responsable de 71% de l'activité phosphatase ciblant Tau dans le cerveau humain (Liu et al., 2005).

Il est intéressant de remarquer que l'hypothermie induit l'hyperphosphorylation de Tau. Celle-ci est la conséquence d'une inhibition plus importante de l'activité des phosphatases comparativement aux kinases sous l'effet de l'hypothermie (Planel et al., 2004, 2007). Parallèlement, l'hyperthermie induit la déphosphorylation de Tau par l'activation de PP2a (Galas et al., 2006; Goldbaum and Richter-Landsberg, 2002).

c La phosphorylation : Régulation des fonctions de Tau

Dès 1977, les travaux de Cleveland et collaborateurs montrent que Tau peut être phosphorylée (Cleveland et al., 1977b). En conséquence, des études ont été menées autour de l'impact de la phosphorylation sur les différentes fonctions de Tau. En voici un aperçu non exhaustif :

En premier lieu, l'intérêt s'est porté sur l'effet de la phosphorylation de Tau sur sa liaison aux microtubules. En 1984, Lindwall et Cole montrent que Tau, sous sa forme déphosphorylée, stimule l'assemblage des microtubules plus efficacement (Lindwall and Cole, 1984). La phosphorylation de Tau sur certains résidus diminue son affinité pour les microtubules (Biernat et al., 1993; Cho and Johnson, 2003; Schneider et al., 1999) et module le transport axonal (Cuchillo-Ibanez et al., 2008; Mudher et al., 2004). La présence de Tau à la membrane est également dépendante de l'état de phosphorylation de sa partie N-terminale (Arrasate et al., 2000; Pooler et al., 2012). Par ailleurs, elle y régule notamment l'interaction de Tau avec la kinase Fyn (Reynolds et al., 2008; Usardi et al., 2011). En matière de plasticité synaptique, la phosphorylation de Tau sur la sérine 396 est nécessaire au processus de LTD (Regan et al., 2015).

Au sujet de la protéine Tau nucléaire, des études *in vitro* ont été menées pour déterminer l'impact de la phosphorylation sur la capacité de Tau à interagir avec l'ADN. Par la technique de retard sur gel, il a été mis en évidence que la protéine Tau phosphorylée par la neuronal cdc2-like kinase (NCLK) conserve la capacité d'interagir avec l'ADN (Hua and He, 2002). NCLK est un hétérodimère composé de la sous-unité catalytique cyclin dependent protein kinase 5 (cdk5) et d'une sous-unité spécifique des neurones : p35 (Qi et al., 1995). Cependant, ce même groupe a publié un travail similaire qui prend le contre-pied de leur première étude. En effet, la protéine Tau phosphorylée *in vitro*, dans ce cas présent, par GSK-3 β prévient l'interaction de Tau avec l'ADN (Lu et al., 2013b). Cette perte d'interaction résulterait d'une modification de

la charge électrostatique de Tau nécessaire à son association à l'ADN. Ces résultats, à priori paradoxaux, peuvent s'expliquer par l'emploi de kinases différentes. En effet, GDK-3 β ciblent des acides aminés que NLCK ne phosphorylent pas (Tenreiro et al., 2014). Ce point suggère que l'effet biologique dépend de l'acide aminé phosphorylé impliqué. L'altération de l'interaction sous l'effet de la phosphorylation a depuis été confirmé par RMN à partir de protéine Tau recombinante phosphorylée au moyen d'extrait de cerveau murin (Qi et al., 2015). Connaître l'état de phosphorylation de Tau dans le noyau apparaît ainsi essentiel. Les travaux de Greenwood et Johnson indiquent que Tau, qu'elle soit cytosolique ou nucléaire présente un niveau de phosphorylation similaire dans les cellules de neuroblastomes humain LA-N-5 (Greenwood and Johnson, 1995). L'existence de Tau nucléaire phosphorylée sur certains épitopes a été confirmée dans d'autres lignées de neuroblastomes ainsi que dans des cultures primaires de neurones murins (Lu et al., 2013a; Shea and Cressman, 1998; Sultan et al., 2011). Historiquement, la localisation de la protéine Tau dans le noyau fut décrite à l'aide de l'anticorps Tau-1 (Loomis et al., 1990; Wang et al., 1993). Cet anticorps reconnaît la protéine Tau déphosphorylée sur les résidus sérine 195, 198, 199 et 202 (Szendrei et al., 1993), de sorte que le pool de protéine Tau nucléaire serait particulièrement déphosphorylée sur ces deux épitopes (Shea and Cressman, 1998; Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014). Dans une étude récente menée *in vivo* dans des cerveaux murins, il est montré, à l'aide d'anticorps phospho-dépendants que Tau nucléaire est hypophosphorylée comparativement à son homologue cytosolique (Lu et al., 2014). L'analyse électrophorétique bi-dimensionnelle de la fraction nucléaire de la protéine Tau dans un modèle de lignée cellulaire surexprimant Tau accreditte l'hypothèse d'une hypophosphorylation de la fraction de Tau nucléaire, au regard de son homologue cytosolique (Lefebvre et al., 2003).

2 Autres modifications post-traductionnelles

De nombreuses autres modifications post-traductionnelles ciblent la protéine Tau telles que la glycosylation, la glycation, la sumoylation, la nitration, l'ubiquitination ou encore l'acétylation. La O-GlcNAcylation, une forme de glycosylation, correspond à l'addition d'un résidu de N-acétylglucosamine sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. Cette modification est particulièrement intéressante car elle partage avec la phosphorylation certains résidus et peut ainsi rentrer en compétition avec elle (Liu et al., 2004, 2009). Cette balance phosphorylation / O-GlcNAcylation a par ailleurs été proposé comme mécanisme de

régulation de la localisation nucléaire de Tau (Lefebvre et al., 2003). On peut également citer l'acétylation, correspondant à l'addition d'un groupement acétyle sur un résidu lysine. De manière intéressante, Tau possède une activité acetyltransférase intrinsèque et peut s'auto-acétyler (Cohen et al., 2013). Néanmoins, à l'image de nombreuses modifications post-traductionnelles, son rôle physiologique reste obscur.

Tau est une protéine ne possédant pas de conformation tridimensionnelle à l'état native. Pourtant, il apparaît que Tau est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires. Il s'avère que les modifications post-traductionnelles jouent un rôle critique dans la structure de Tau et la régulation de ses nombreuses fonctions. En conséquence, une dérégulation de ces modifications peut doter Tau d'un impact délétère et d'une portée pathologique pour le neurone.

B. La physiopathologie de la protéine Tau

Traditionnellement, l'histoire de la pathologie Tau est ainsi racontée : En 1906, au cours de la 37^{ème} Conférence des psychiatres allemands à Tübingen, Aloïs Alzheimer décrit le cas atypique d'une patiente souffrant d'une démence présénile. Si cette présentation ne souleva alors aucune question parmi les membres de l'auditoire, elle constitue pourtant la première description neuropsychologique de la célèbre maladie qui portera son nom : la maladie d'Alzheimer. Du nom d'Auguste Deter, le sujet souffre notamment de troubles de la mémoire, du langage, de désorientation, d'hallucinations et de paranoïa. Lors de l'examen post-mortem du cerveau de la patiente, il constate une sévère atrophie corticale. Grâce aux méthodes d'imprégnation argentique, le Dr. Aloïs Alzheimer mis remarquablement en évidence la présence concomitante dans le cortex de deux types de lésions, des dépôts entre les cellules ou plaques ainsi que des enchevêtrements intracellulaires ou dégénérescences neurofibrillaires. Il faudra attendre 80 ans pour découvrir l'élément constitutif de la dégénérescence neurofibrillaire : la protéine Tau (Brion et al. 1985, Grundke-Iqbal et al., 1986).

I. Les tauopathies

En effet, cette agrégation intra-neuronale de protéine Tau sous forme de fibrilles est une lésion histologique caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Toutefois, cet attribut est également partagé par un large éventail de maladies neurodégénératives regroupés sous le terme « tauopathies ». On dénombre une vingtaine de tauopathies telles que la maladie d'Alzheimer, le syndrome de Down, la dégénérescence lobaire fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17, la dégénérescence cortico-basale, la maladie de Pick ou encore l'encéphalite traumatique des pugilistes.

1 Classification

Face à la diversité de ces pathologies est né le besoin de les classer. Différentes classifications co-existent selon des considérations cliniques ou neuropathologiques. Elles évoluent continuellement au rythme des progrès en matière génétiques et physiopathologiques.

a Point de vue clinique

D'un point de vue clinique, les tauopathies présentent un tableau clinique très hétérogène. Elles peuvent prendre la forme de troubles cognitifs ou de syndrome extra-pyramidal. Concernant les troubles cognitifs, on distingue schématiquement la maladie d'Alzheimer, correspondant à une atteinte précoce et significative de la mémoire des autres tauopathies associées à des troubles du langage ou du comportement. Outre les désordres mnésiques, on considère deux variantes parmi les troubles cognitifs relatifs aux tauopathies. La première est la variante comportementale. Le patient présente une modification progressive de sa personnalité telle qu'une désinhibition, un comportement à l'encontre des convenances sociales, une apathie, des troubles obsessionnels, des modifications du comportement alimentaire... L'aphasie primaire progressive constitue la seconde variante. Celle-ci peut se décliner sous différentes formes. Elle peut être sémantique : le patient rencontre des problèmes de compréhension et d'identification d'objets. Il perd le sens des mots. Elle peut également être qualifiée d'aphasie non-fluente progressive. Celle-ci est associée à des troubles moteurs de la parole et provoque une incapacité à parler de manière fluide. Enfin, la variante dite logopénique

est caractérisée par une diminution de la vitesse d'élocution associée à des difficultés à se remémorer les mots.

Les patients affectés par des tauopathies peuvent également présenter une atteinte motrice, associée à un syndrome extrapyramidal ou une atteinte du motoneurone.

Cette classification n'est pas exempte de toutes réserves. Elle ne corrèle pas de manière stricte avec le versant neuropathologique. En effet, ces symptômes sont déterminés par la structure cérébrale affectée. Or, des maladies neurodégénératives autres que les tauopathies impliquent également ces zones et produisent des manifestations cliniques similaires. De plus, pour une tauopathie considérée, les tableaux cliniques sont hétérogènes et peuvent ainsi croiser avec des symptômes caractéristiques d'une autre tauopathie. Une progression hiérarchisée, séquentielle des lésions au sein du tissu cérébral a pu être décrite pour certaines tauopathies. Celle-ci conduit au grès des structures affectées au développement d'autres signes cliniques. La « constellation » de ces symptômes peut étayer le diagnostic. Par voie de conséquence, compte-tenu de l'hétérogénéité de ces manifestations cliniques, seul l'examen post-mortem permet de porter un diagnostic neuropathologique définitif. Ce constat souligne l'intérêt de l'imagerie et la recherche de biomarqueurs fiables permettant d'identifier la tauopathie et d'adopter une stratégie thérapeutique adaptée et efficace.

b Considérations neuropathologiques

Les tauopathies sont caractérisées par des inclusions de protéines Tau intraneuronales dans le système nerveux central. L'examen histologique de ces inclusions nous révèle qu'elles prennent différentes formes selon la tauopathie telles que la dégénérescence neurofibrillaire dans la maladie d'Alzheimer ou les corps de Pick dans la maladie de Pick. De plus, celle-ci affecte des populations neuronales différentes. Elle peut d'ailleurs être également observée dans les cellules de la glie au cours de certaines pathologies (Fig. 7) (Kahlson and Colodner, 2015).

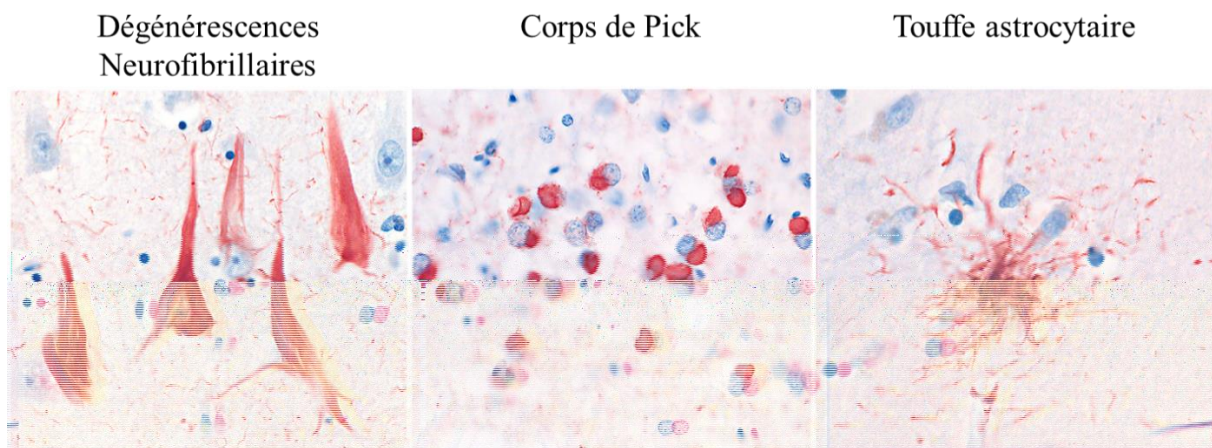


Figure 7 – Différents aspects des inclusions de protéines Tau dans différentes tauopathies. Immunohistochimies réalisées à l'aide de l'anticorps anti-Tau AT8 dirigé contre des épitopes phosphorylés de la protéine Tau : sérine 202 et Thréonine 205. De gauche à droite, l'agrégation de Tau peut prendre la forme de dégénérescences neurofibrillaires présentes notamment dans la maladie d'Alzheimer ou de corps de Pick observés dans la maladie de Pick. Une accumulation de Tau peut également être observée dans les cellules de la glie. A titre d'exemple, à droite, la touffe astrocytaire correspond à une accumulation de la protéine Tau au sein d'astrocyte. Cette lésion est observée dans la paralysie supranucléaire progressive. (Extrait de Tolnay and Probst, 2003)

Au sein de ces agrégats, la protéine Tau est hyperphosphorylée, cette caractéristique pathologique sera discutée dans la partie 2.2. Ces lésions intra-neuronales conduisent inéluctablement à la mort neuronale et engendrent une atrophie de certaines structures cérébrales caractéristiques de la tauopathie considérée. La distribution de ces lésions au sein du cerveau est étroitement corrélée aux manifestations cliniques. L'analyse biochimique de ces inclusions met en évidence des variations dans leur composition en protéine Tau. Ainsi, les isoformes de Tau qui composent ces lésions diffèrent entre les tauopathies. A titre d'exemple, les lésions observées dans la maladie de Pick montrent une immunoréactivité uniquement pour les isoformes Tau 3R tandis que celles associées à la paralysie supranucléaire progressive présentent une immunoréactivité uniquement pour les isoformes Tau 4R. Concernant la maladie d'Alzheimer, les dégénérescences neurofibrillaires sont composées des isoformes 3R et 4R. Cette particularité constitue une signature, un « code-barres » permettant de classer les différentes tauopathies dans cinq familles selon la nature des isoformes présentes (Sergeant et al., 2008) (Fig. 8).

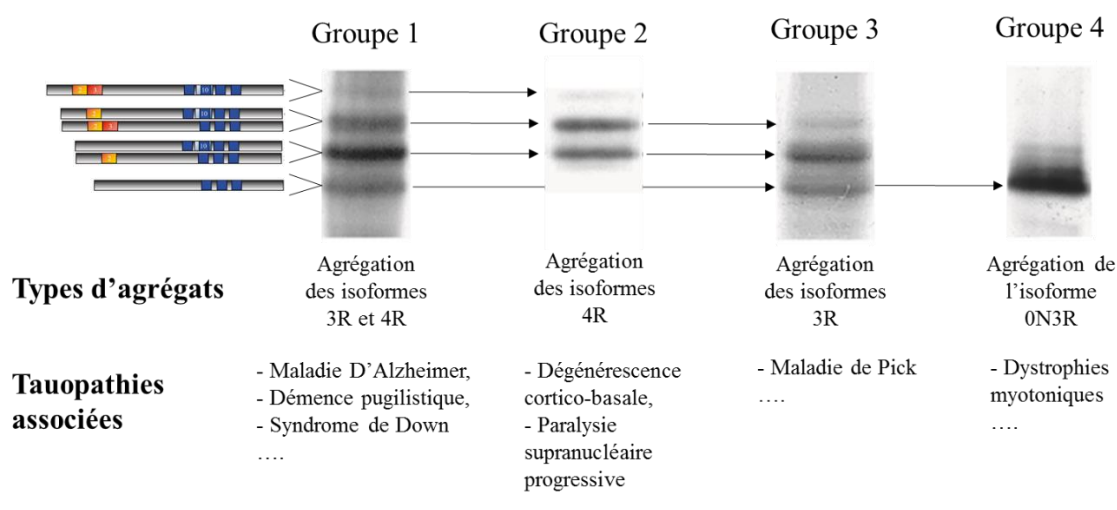


Figure 8 – Le code-barre des tauopathies. Immunoempreinte dirigée contre les protéines Tau phosphorylées provenant de tissus de patients atteints par différents types de Tauopathies. Il en ressort 4 modèles de migration électrophorétique différents correspondant à une agrégation d'isoformes de protéines Tau différentes selon la tauopathie considérée. Ainsi, un classement des Tauopathies en fonction des différentes isoformes de protéines Tau constituant les agrégats a été mis en place. Le groupe 1 correspond aux tauopathies dans lesquelles l'ensemble des isoformes 3R et 4R sont présentes dans les agrégats. Le groupe 2 est associé à l'agrégation des isoformes 4R uniquement tandis que le groupe 3 correspond à la présence dans les agrégats des isoformes 3R uniquement. Les agrégats observés dans les tauopathies du groupe 4 ne sont constitués que de l'isoforme 0N3R (extrait de Sergeant et al., 2008).

Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à la maladie d'Alzheimer, la plus fréquente des tauopathies ainsi qu'au FTDP-17 formes familiales de tauopathies associées à des mutations du gène MAPT.

2 Maladie d'Alzheimer

a Quelques données épidémiologiques

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus commune de démence. En effet, celle-ci représente entre 50 et 70% des cas de démence (Fratiglioni et al., 1999, 2001). A ce titre, elle constitue un enjeu majeur de santé publique. Selon le « World Alzheimer Report 2015 », on estime environ 47 millions de personnes affectées à travers le monde. D'après les projections épidémiologiques, ce chiffre devrait croître à 70 millions en 2030 et atteindre 131 millions de personnes en 2050. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que la maladie d'Alzheimer revêt un caractère épidémique. Toutefois, un faisceau d'études récentes montrent un déclin progressif de l'incidence des démences dont la maladie d'Alzheimer dans les pays développés

(Satizabal et al., 2016). Cette tendance s'expliquerait par l'amélioration de l'hygiène de vie : alimentation, activité physique ainsi qu'une diminution de la consommation de tabac et d'alcool (Pour revue Arab and Saggabh, 2010).

b Définition clinique

La maladie d'Alzheimer progresse lentement et grossièrement selon trois stades. Le premier stade est dit « Mild Cognitive Impairment » (MCI), correspondant à la phase prodromique. Ces premiers symptômes consistent en des troubles de la mémoire épisodique à court-terme accompagnés d'une amnésie antérograde, c'est-à-dire une difficulté à stocker de nouvelles informations. La mémoire épisodique est une forme de mémoire explicite et permet de se souvenir d'évènements vécus et de leurs contextes. Le stade modéré correspond typiquement à la phase la plus longue de la maladie. Son évolution va conduire vers un déclin progressif et sévère des fonctions cognitives, une détérioration de la mémoire à long-terme et s'accompagner d'une apraxie, d'une agnosie et d'une aphasie. Ces perturbations accentuent les difficultés du patient à planifier et s'orienter. Parfois, des troubles comportementaux tels qu'une agressivité et de la paranoïa apparaissent. A terme, le patient sombre inéluctablement vers une perte totale d'autonomie, on parle alors de stade sévère. Cette détérioration est lente et peut s'étaler sur une longue période de vie. Aux stades très sévères de la pathologie, le décès survient à cause de facteurs externes : dénutrition, infection, asphyxie.

c Neuropathologie

A l'échelle macroscopique, l'examen anatomopathologique et l'analyse IRM révèlent que la maladie est caractérisée par une atrophie symétrique progressive du cortex et d'un élargissement des ventricules latéraux (Fig. 9). La première zone affectée est le lobe médian du cortex temporal en particulier le cortex enthorinal et l'hippocampe (Braak and Braak, 1991). Puis, l'atrophie se propage de manière stéréotypée au cortex temporal et enfin à l'ensemble des aires associatives du néocortex (Migliaccio et al., 2015). Cette perte est la conséquence directe de la mort neuronale.

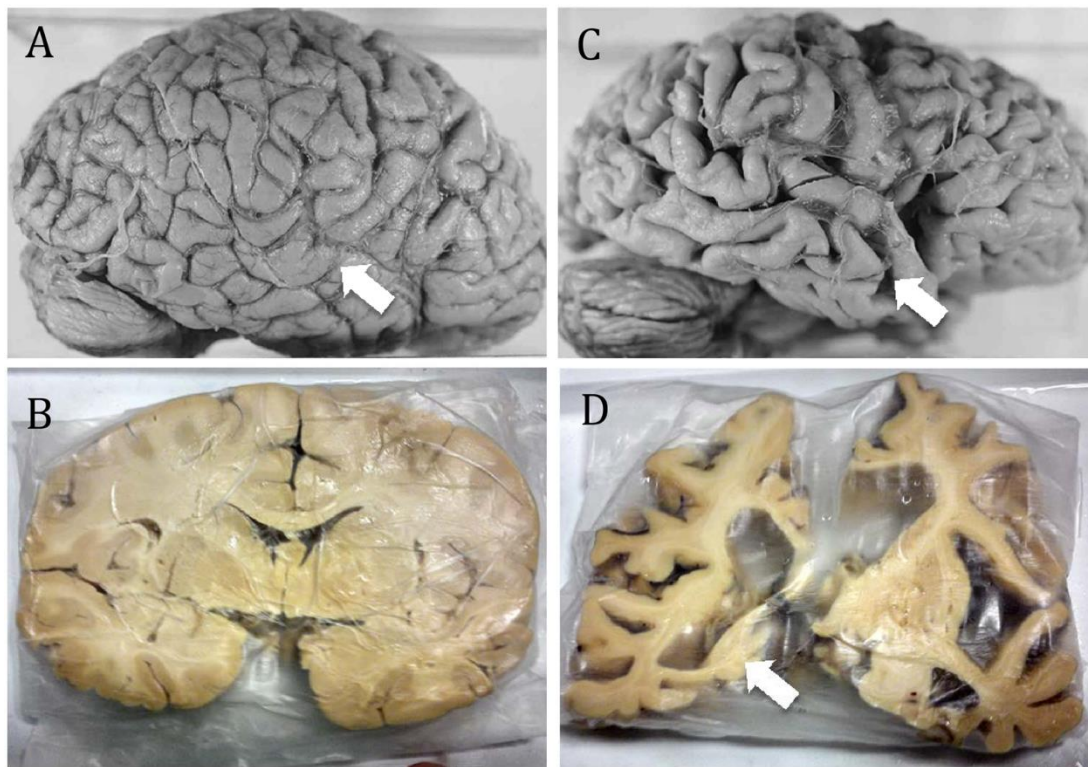
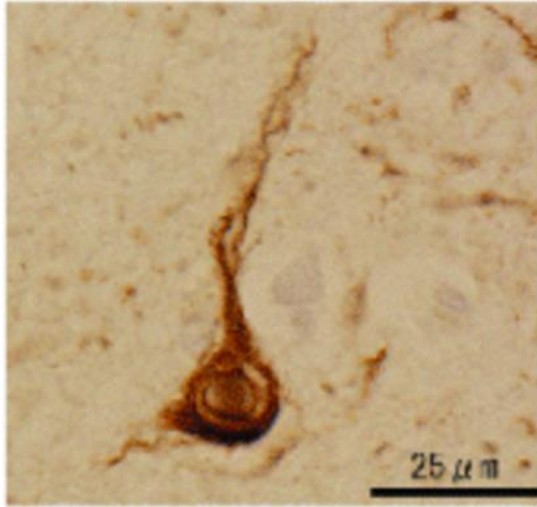


Figure 9 – Comparaison neuro-anatomique du cerveau d'un sujet contrôle et d'un patient Alzheimer. Une importante atrophie du cerveau et un élargissement des ventricules sont observés au niveau du cerveau du patient Alzheimer (C-D) comparativement au cerveau du sujet contrôle (A-B). La flèche blanche indique la position de l'hippocampe. (Extrait de Soto-Rojas et al., 2015)

L'analyse histopathologique de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer montre la présence caractéristique de deux stigmates : des plaques amyloïdes extracellulaires ainsi que des dégénérescences neurofibrillaires intraneuronales (Fig. 10).

Dégénérescence Neurofibrillaire



Plaques amyloïdes

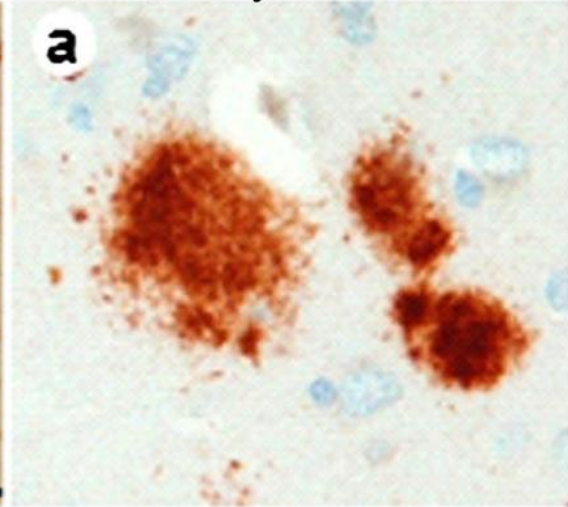


Figure 10 – Lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. A gauche, une dégénérescence neurofibrillaire mis en évidence par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps anti-Tau AT8 dirigé contre des épitopes phosphorylés de la protéine Tau : sérine 202 et Thréonine 205 (extrait de Hasegawa, 2006). A droite, des plaques amyloïdes mis en évidence par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps dirigé contre le peptide β -amyloïde 33.1.1 (extrait de Murray et al., 2014).

i. Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes résultent de l'accumulation extra-cellulaire du peptide beta amyloïde. Deux espèces de peptides beta amyloïde composent ces plaques : l' $A\beta_{40}$ et l' $A\beta_{42}$, correspondant respectivement aux nombres d'acides aminés dont ils sont respectivement constitués. Ces peptides sont des produits de clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), une protéine transmembranaire, présente dans les neurones. La production d' $A\beta$ est le fruit de la voie amyloïdogénique correspondant au clivage séquentiel de l'APP par des beta et gamma secrétases (Fig. 11).

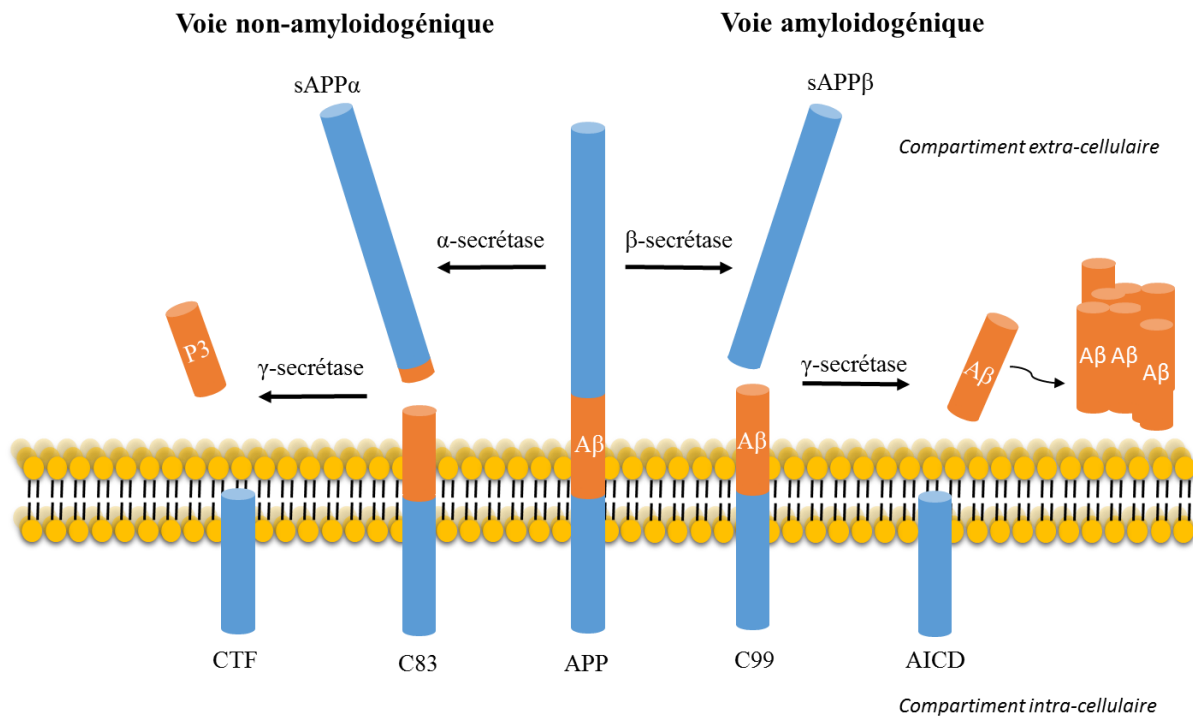


Figure 11 – Protéolyse de l'APP. Le métabolisme de la protéine APP peut se faire selon deux voies : la voie amyloïdogénique et non-amyloïdogénique. La voie non-amyloïdogénique correspond au clivage séquentiel de l'APP par l'α-sécrétase et la γ-sécrétase. La voie amyloïdogénique correspond au clivage séquentiel de l'APP par la β-sécrétase et la γ-sécrétase et conduit à la production du peptide Aβ.

Dans la maladie d'Alzheimer, la distribution de ces dépôts de peptides beta amyloïde progresse selon une séquence bien décrite nommée stades de Thal. Initialement présentes dans le néocortex, les lésions vont peu à peu toucher le cortex enthorinal, l'hippocampe puis affecter des structures plus profondes tels que le thalamus, l'hypothalamus, les ganglions de la base notamment (Thal et al., 2002) (Fig. 12).

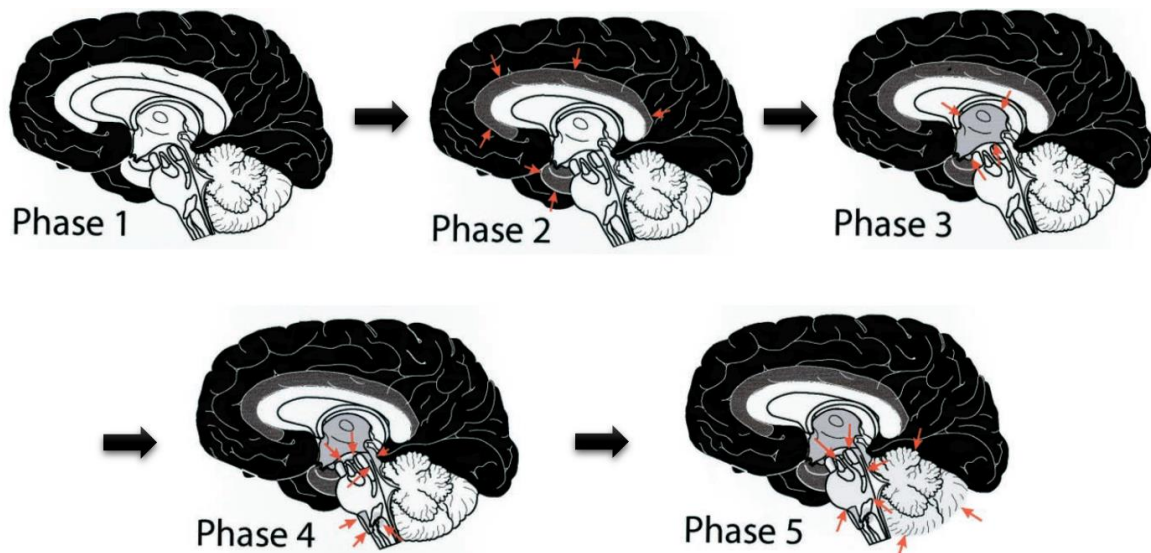


Figure 12 – Progression des plaques amyloïdes au cours de la pathologie Alzheimer. Lors de la phase 1, les plaques amyloïdes sont localisées au sein de l'isocortex (en noir). La phase 2 est caractérisée par l'atteinte de structures allocorticales telles que l'hippocampe et l'amygdale. Au cours de la phase 3, les plaques amyloïdes atteignent le diencephale et le striatum. Aux phases ultimes, 4 et 5, une atteinte des noyaux du tronc cérébral apparaît. De plus, la phase 5 est associée à une apparition de plaques amyloïdes au sein du cervelet (adaptée de Thal et al., 2002).

ii. Les dégénérescences neurofibrillaires

L'examen au microscope électronique de l'ultrastructure des dégénérescences neuro-fibrillaires a permis de dévoiler leur nature fibrillaire. Elles sont principalement composées de fibrilles hélicoïdales appariées ou PHF (Paired Helicoidal Fibrils) (Kidd et al., 1963). L'isolation de ces PHF à partir de cerveaux de patients Alzheimer permet la caractérisation biochimique de son principal composant : une protéine d'environ 50kDa appartenant à la famille des MAP (Grundke-Iqbal et al., 1979; Iqbal et al., 1974). En 1985, à l'aide d'anticorps anti-DNF et anti-Tau, une étude publiée en français identifie Tau comme l'élément principal des dégénérescences neuro-fibrillaires (Brion et al., 1985). Dans la foulée, de nombreux travaux confirmèrent ce résultat (Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986a; Ihara et al., 1986; Kosik et al., 1986). La même année, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, au sein des DNF, est décrite pour la première fois (Grundke-Iqbal et al., 1986b).

L'évolution spatiotemporelle de ces lésions est stéréotypée, hiérarchisée. Ainsi différents « stades de Braak » décrivent l'évolution topographique de ces lésions et permettent d'évaluer la gravité de la pathologie. Aux premiers stades de la pathologie, les DNF sont

localisés au niveau du cortex trans-enthorinal. Puis, les DNF progressent vers le cortex limbique au niveau de l'hippocampe, structure qualifiée de « siège de la mémoire ». Les lésions gagnent ensuite les aires associatives du néocortex. Aux stades les plus sévères de la pathologie, la présence de DNF est généralisée dans l'ensemble du cortex (Fig. 13) (Braak and Braak, 1997; Delacourte et al., 1999). De surcroît, la progression de ces lésions est corrélée avec le déclin cognitif observée chez les patients (Delacourte et al., 1999; Duyckaerts and Hauw, 1997).

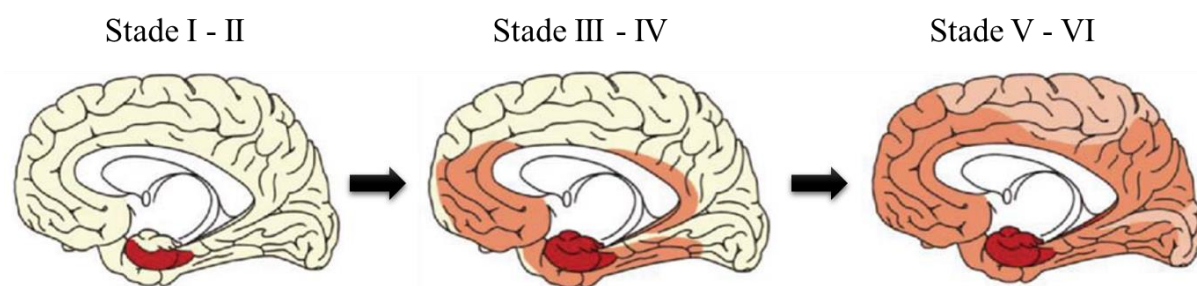


Figure 13 – Progression de la dégénérescence neurofibrillaire au cours de la maladie d'Alzheimer. L'apparition des DNF progresse de façon stéréotypée au sein des structures cérébrales et forme un continuum. Les premières DNF apparaissent dans le cortex trans-enthorinal (Stade I) puis envahissent le cortex enthorinal et la région de la CA1 de l'hippocampe (stade II). Ensuite, l'ensemble de l'hippocampe est atteint et des DNF apparaissent dans le cortex associatif (stade III et IV). Aux stades ultimes, elles gagnent l'ensemble des aires corticales (adaptée de Braak and Del Tredici, 2013)

d Une maladie multifactorielle

On distingue les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer des formes familiales. A l'exception de ces formes héréditaires causées par des mutations de gènes spécifiques, la maladie d'Alzheimer résulte d'un ensemble de facteurs de risques.

Parmi eux, le plus déterminant est l'âge. Bien que relativement démunie face à ce dernier, d'autres facteurs de risques sur lesquels nous pouvons avoir une emprise partielle existent. De nombreuses études appuient sur l'importance de facteurs associés à notre mode de vie tels que les risques cardio-vasculaires, l'hypertension, le diabète, l'obésité, la dépression, l'inactivité physique, un faible entretien de la réserve cognitive, le tabagisme ou le régime alimentaire (Norton et al., 2014). De manière intéressante, les actions de préventions de ces risques ont permis de diminuer l'incidence des cas de démences d'environ 30% d'après une étude épidémiologique réalisée aux Pays-Bas sur 10000 participants (De Bruijn et al., 2015).

Des facteurs de susceptibilité génétique existent. Parmi eux, l'allèle apolipoprotéine $\epsilon 4$ (APOE4) a été identifié comme le principal facteur de risque génétique pour développer une maladie d'Alzheimer. APOE est un transporteur du cholestérol impliqué dans la clairance du peptide $A\beta$ (Castellano et al., 2011). Les porteurs hétérozygotes et homozygotes de l'allèle $\epsilon 4$ sont respectivement 3 et 12 fois plus susceptibles d'être affectés comparativement aux porteurs du génotype le plus fréquent $\epsilon 3/\epsilon 3$ (Corder et al., 1993). Récemment, des études d'associations pangénomiques (Genome Wide Association Study) ont permis d'identifier une vingtaine de loci de susceptibilité (pour revue Van Cauwenberghe et al., 2016).

Outre ces formes dites « sporadiques », moins de 1% des cas Alzheimer correspondent à des formes familiales résultants de mutations localisées dans trois gènes : le gène de l'APP, de la préséniline 1 et 2 (Bekris et al., 2010). Ces présénilines appartiennent au complexe gamma sécrétase impliqué dans la production du peptide $A\beta$ (Karran et al., 2011). Ces formes autosomales dominantes sont caractérisées par une apparition précoce de la pathologie.

e L'hypothèse de la cascade amyloïde : la pathologie Tau est-elle un épiphénomène ?

Ces formes génétiques de la maladie d'Alzheimer associées à l'APP ont conduit à l'émergence de l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy and Higgins, 1992). Elle postule que l'agrégation des peptides beta amyloïdes en plaque est le phénomène central à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Cette théorie est appuyée par les observations réalisées chez les patients souffrant de trisomie du chromosome 21, possédant de fait trois copies du gène APP. Ces derniers présentent un risque accru de développer une démence de type Alzheimer.

Cependant, cette hypothèse est controversée. En effet, de manière inattendue, l'apparition des DNF précèdent généralement celle des dépôts amyloïdes (Duyckaerts and Hauw, 1997). Ainsi Braak rapporte que la pathologie Tau se développe avant l'agrégation d' $A\beta$ et qu'aucun sujet Alzheimer ne présente de pathologie $A\beta$ sans pathologie Tau (Braak et al., 2011). De plus, à l'inverse des lésions amyloïdes, la distribution spatio-temporelle des DNF est corrélée au déclin cognitif au cours de la maladie d'Alzheimer (Dickson et al., 1995; Giannakopoulos et al., 2003).

S'éloignant de la représentation linéaire que proposait originellement la cascade amyloïde, de nombreuses études tendent à montrer que la pathologie Tau et beta amyloïde agissent en synergie (pour revue Bloom, 2014).

3 DLFT liée au chromosome 17

Dans les années 1990, des analyses de liaison génétique montrent une association du chromosome 17 avec des formes familiales de démence lobaire fronto-temporale (Murrell et al., 1997; Wilhelmsen et al., 1994). Ces démences sont alors regroupées sous la terminologie de Démence Fronto-Temporale et Parkinsonisme lié au chromosome 17 (FTDP-17) (Foster et al., 1997). Rapidement, au cours de l'année 1998, ces études sont corroborées par la mise en évidence de mutations du gène MAPT chez les patients FTDP-17 (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Dès lors, la protéine Tau apparaît comme une protéine clef dans l'étiopathologie de maladies neurodégénératives.

Ces mutations sont principalement localisées au niveau des différents domaines de liaison aux microtubules, particulièrement au niveau de l'exon 10 et de sa séquence intronique flanquante en aval. Le rôle de ces mutations dans la pathologie Tau sera discuté dans la partie II. 1.

D'un point de vue clinique, une même mutation peut conduire à des manifestations cliniques hétérogènes telles qu'une FTD ou un syndrome parkinsonien (Bugiani et al., 1999; Reed et al., 2001). Cette variabilité pose la question de l'influence du fond génétique et notamment de l'impact des différents haplotypes de Tau (Baba et al., 2005).

L'identification de ces mutations a offert la possibilité de générer des modèles transgéniques présentant une hyperphosphorylation et une agrégation de la protéine Tau. Elles constituent des outils précieux pour la compréhension des mécanismes pathologiques associés à Tau et son interaction avec la pathologie beta amyloïde dans le cas de la maladie d'Alzheimer.

4 Le stress oxydant, phénomène commun aux Tauopathies

La théorie du vieillissement par le stress oxydant a été développée dans les années 50 par D. Hartman. Elle postule que l'accumulation de dommages oxydatifs au sein des cellules

conduit à la détérioration progressive du fonctionnement cellulaire menant au vieillissement et *in fine* à l'augmentation de l'incidence de pathologies liées à l'âge (Harman, 1956).

Dans des conditions normales, une homéostasie cellulaire existe entre la production endogène d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), pro-oxydantes, et les défenses antioxydatives qui détoxifient ces intermédiaires réactifs ou réparent les dommages induits. Le stress oxydant apparaît lors du déséquilibre de cette balance vers un renforcement de la production de ces molécules pro-oxydantes et/ou l'affaiblissement des défenses cellulaires.

Les ROS sont des espèces chimiques oxygénées caractérisées par leur forte réactivité chimique. Parmi ces ROS, les espèces radicalaires sont particulièrement réactives en raison de la présence d'électrons de valence non-appariés qui vont causer des dommages oxydatifs sur des molécules telles que les protéines, les lipides ou les acides nucléiques.

Ces ROS peuvent avoir une origine exogène, leur production peut être induite par le rayonnement ionisant, la pollution ou le tabagisme. Elles sont également produites de manière endogène à travers notamment l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les dommages oxydatifs sont de différentes nature en fonction de la biomolécule altérée. Ainsi, les lipides peuvent être peroxydés, notamment les acides gras poly-insaturés particulièrement vulnérables et dont les membranes plasmiques neuronales sont riches. Les protéines peuvent également être oxydées. Un des dommages les plus importants est l'ajout d'un groupement carbonyle au niveau de la chaîne latérale des acides aminés. Concernant les acides nucléiques, ADN et ARN, le produit de leur oxydation peut former des dommages de types 8-hydroxydésoxyguanosine ou 8-hydroxyguanosine et constituent les biomarqueurs du stress oxydant les plus étudiés. D'autres dommages peuvent être induits par les ROS tels que des ruptures des brins des acides nucléiques (Bertoncini and Meneghini, 1995; Li et al., 2006). La cellule a développé différentes stratégies pour se prémunir de ces dommages. Elles possèdent des enzymes capables de neutraliser les ROS tels que la glutathione peroxidase (GPx) et la superoxide dismutase (SOD). D'autres mécanismes antioxydant non enzymatique existent comme les protéines possédant un groupement thiol, le glutathion ou encore la vitamine C.

Il est établi qu'à lui seul, le cerveau consomme 20% des besoins en glucose et en oxygène de l'organisme (Clarke and Sokoloff, 1999, Mergenthaler et al., 2013). Outre leurs besoins énergétiques conséquents, l'importante longévité des neurones (Magrassi et al., 2013) suggère qu'ils doivent être la cible de nombreuses agressions oxydatives. Compte tenu de

l'impact du stress oxydant dans le vieillissement, l'hypothèse de son implication dans les processus neurodégénératifs tels que les tauopathies a rapidement éclos.

De fait, de nombreuses études mettent en évidence la présence de dommages induits par le stress oxydant dans les tauopathies (Alavi Naini et al., 2015). Fait intéressant, un faisceau d'études montrent que le stress oxydant serait un phénomène précocement impliqué dans la maladie d'Alzheimer suggérant un rôle du stress oxydant dans l'étiologie de la pathologie (Bradley-Whitman et al., 2014; Nunomura et al., 2012).

II. Hyperphosphorylation et agrégation de Tau : mécanismes pathologiques communs aux tauopathies

Malgré l'hétérogénéité clinique et neuropathologique des tauopathies, l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau constituent leur dénominateur commun.

1 Des mutations du gène MAPT promotrices de la pathologie Tau

On dénombre une cinquantaine de mutations du gène MAPT qui conduisent au développement d'une tauopathie (Fig. 14). Ces mutations sont autosomales dominantes et à pénétrance complète sauf à quelques rares exceptions. On distingue des mutations faux-sens, des mutations silencieuses et des micro-délétions. Les mutations faux-sens sont pour la plupart localisées au niveau des domaines de liaison aux microtubules. Elles octroient généralement à la protéine Tau une affinité plus faible pour les microtubules et, par voie de conséquence, une capacité à stabiliser et promouvoir la polymérisation des microtubules moindre (Hasegawa et al., 1998; Hong et al., 1998). Certaines mutations facilitent la phosphorylation de la protéine Tau réduisant son habilité à interagir avec les microtubules et stimulant son agrégation (Alonso et al., 2004, 2010). Enfin, des mutations faux-sens peuvent également altérer l'épissage de l'exon 10 et modifier le ratio Tau4R/Tau3R (Hasegawa et al., 1999). Certaines mutations silencieuses du gène MAPT perturbent également cette balance Tau4R/Tau3R (Stanford et al., 2003). Ses conséquences directes sur l'agrégation de Tau demeurent obscures mais soulignent l'importance de l'équilibre entre ces deux types d'isoformes. Deux micro-délétions impliquant

un acide aminé ont été décrites pour le gène de Tau. Parmi elles, la mutation deltaK280 est remarquable car particulièrement fibrillogène (von Bergen et al., 2001).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons recouru à l'utilisation de trois mutants MAPT : G272V, P301S et P301L, une des mutations les plus communes du gène MAPT. Ainsi, les mutations G272V et P301L confèrent à la protéine Tau une propension plus importante à être phosphorylée (Alonso et al., 2004), se détacher des microtubules et s'agréger (Barghorn et al., 2000; von Bergen et al., 2001; Chang et al., 2008; Hasegawa et al., 1998). La littérature est moins riche au sujet de la mutation P301S, celle-ci diminue la capacité de Tau à promouvoir la polymérisation des microtubules (Bugiani et al., 1999).

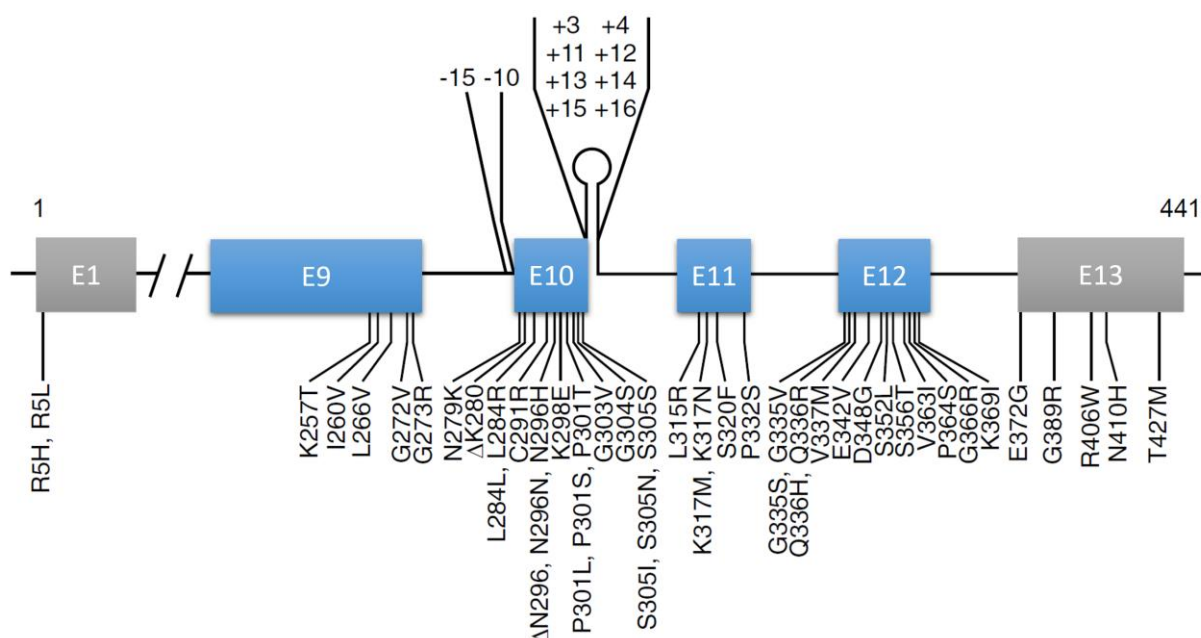


Figure 14 – Mutations du gène MAPT. Ensemble des mutations pathologiques connues pour le gène MAPT impliquées dans les démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17. Elles sont localisées principalement au sein de l'exon 1, 9, 10, 11 ainsi que dans les introns flanquants l'exon 10 (adaptée de Goedert, 2016).

2 L'agrégation de la protéine Tau

Dépourvue de conformation tri-dimensionnelle à l'état natif, la protéine Tau au sein des PHF adopte paradoxalement une organisation très structurée. On distingue deux zones dans ces polymères de Tau : une partie sensible aux protéases et un cœur résistant à la digestion protéasique (Ruben et al., 1995; Wischik et al., 1988). La partie sensible aux protéases correspond à l'extrémité N-terminale projetée tandis que le cœur des PHF est formé des domaines répétés de liaison aux microtubules (Crowther et al., 1989). L'agrégation de Tau

résulte de l'adoption d'une conformation en feuillets beta (von Bergen et al., 2005). Deux hexapeptides VQIINK and VQIVYK localisés respectivement dans le deuxième et troisième domaine de liaison montrent une haute propension à former ces feuillets beta responsables de l'agrégation de Tau (von Bergen et al., 2000). Ces deux motifs sont suffisants pour former des fibres *in vitro* (Sawaya et al., 2007). La conformation normale de la protéine Tau en trombone ou « en forme de S » permet de cacher ces structures critiques et éviter l'auto-agrégation. Il semble donc qu'au cours de la pathologie, l'exposition de ces motifs pro-agrégatifs amorcerait la réaction de polymérisation (Fig. 15) (Elbaum-Garfinkle and Rhoades, 2012; Jeganathan et al., 2006). Déterminer la nature de l'élément déclencheur de la fibrillogénèse constitue ainsi un enjeu majeur. De nombreux polyanions, promoteurs de l'agrégation ont été mis en évidence *in vitro* (von Bergen et al., 2005). Ces derniers diminuent la répulsion électrostatique entre les domaines de liaison aux microtubules stabilisant ainsi le polymère de Tau. De manière intéressante les acides nucléiques peuvent également stimuler l'agrégation de Tau. En effet, l'assemblage de protéine Tau est induite par l'ARN *via* la création d'un pont dissulfure intermoléculaire au niveau de la cystéine 322 (Kampers et al., 1996). Un effet similaire de l'ADN sur l'agrégation des domaines de liaison aux microtubules a également été rapporté (Hikosou et al., 2007).

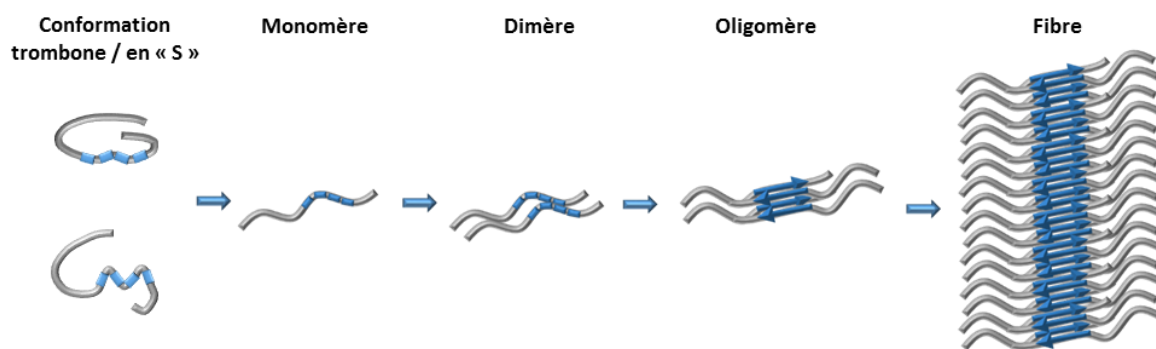


Figure 15 – Modèle de fibrillogénèse de la protéine Tau. Au cours de la pathologie, sous l'effet d'un inducteur, le monomère de protéine Tau va perdre sa conformation en S ou en trombone, démasquant ainsi les motifs VQIINK et VQIVYK, localisés dans le deuxième et troisième domaine de liaison aux microtubules. Ces motifs ont une haute propension à former des feuillets β . Différentes protéines Tau vont s'associer, former un oligomère constitué d'un cœur de feuillets β correspondant aux domaines de liaisons aux microtubules. Ils vont ensuite recruter d'autres protéines Tau et former des fibres insolubles.

3 L'hyperphosphorylation de la protéine Tau

Pour une mole de protéine Tau extraite de cerveaux de sujets contrôle, celle-ci arbore entre 2 et 3 moles de phosphate. En revanche, une mole de protéine Tau extraite des PHF de cerveaux de patients Alzheimer porte 6 à 8 moles de phosphate. En d'autres termes, Tau est approximativement 2 à 3 fois plus phosphorylée dans les cerveaux Alzheimer (Köpke et al., 1993; Ksiezak-Reding et al., 1992). Au regard des 9 sites phosphorylés identifiés dans les cerveaux de sujets contrôles, environ 40 sites ont été mis en évidence comme phosphorylés dans les cerveaux Alzheimer (Hanger et al., 1998; Hasegawa et al., 1992; Morishima-Kawashima et al., 1995). Ils sont principalement localisés dans le domaine riche en proline et la partie carboxy-terminale de Tau (Fig. 16). Néanmoins, il semblerait que Tau soit physiologiquement phosphorylé sur la plupart des sites observés dans les cerveaux Alzheimer (Matsuo et al., 1994). Cette sous-estimation réside dans la nature autopsique des cerveaux utilisés pour ces études. En effet, au cours du délai post-mortem, les protéines Tau solubles subissent une rapide déphosphorylation au contraire des protéines Tau localisées dans les PHF (Matsuo et al., 1994; Wang et al., 2015). Cette différence s'expliquerait par une diminution de l'activité des phosphatases ou une accessibilité moindre des PHF pour ces phosphatases (Gong et al., 1995; Ksiezak-Reding et al., 1992; Yamamoto et al., 1995). Cela suggère que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau résulte d'un excès général de phosphorylation plutôt que de la phosphorylation de sites pathologiques.

Dès lors, une altération de la balance des niveaux d'activité entre kinase et phosphatase a été suggérée comme impliquée dans cette hyperphosphorylation pathologique. Il a pu être observé que différentes kinases, telles que CDK5 et GSK3 β , co-localisent avec les DNF (Pei et al., 1998; Yamaguchi et al., 1996), suggérant leur implication dans l'hyperphosphorylation de Tau. D'ailleurs, dans un modèle de souris transgénique de sur-activation de la kinase CDK5, Tau est hyperphosphorylée. En parallèle, ces souris présentent une apparition progressive de DNF associée à une perte neuronale hippocampique et corticale (Cruz et al., 2003). De même, la sur-expression de GSK3 β dans un modèle murin induit une hyperphosphorylation de Tau associée à des troubles mnésiques (Hernández et al., 2002; Lucas, 2001). Lorsque ces modèles transgéniques sont croisés avec des individus porteurs de mutations pathologiques sur le gène de Tau, la sur-expression de ces kinases potentialisent l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau (Engel et al., 2006a; Noble et al., 2003). Ces processus sont annulés grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de ces kinases (Engel et al., 2006b; Sundaram et al., 2013). Cependant, la relative aspécificité de certains inhibiteurs de kinases et l'effet pleiotrope des kinases forment un écueil

non négligeable dans l'interprétation de ces études. L'altération de l'expression ou de l'activité de ces kinases dans le cerveau des patients Alzheimer est controversée (Camins et al., 2006; Jin et al., 2015; Leroy et al., 2007; Tandon et al., 2003). Quant aux phosphatases, l'activité de PP2A, principale phosphatase de Tau, est réduite d'environ 30% dans les cerveaux de patients Alzheimer suggérant son implication dans la l'hyperphosphorylation pathologique de Tau (Gong et al., 1993, 1995).

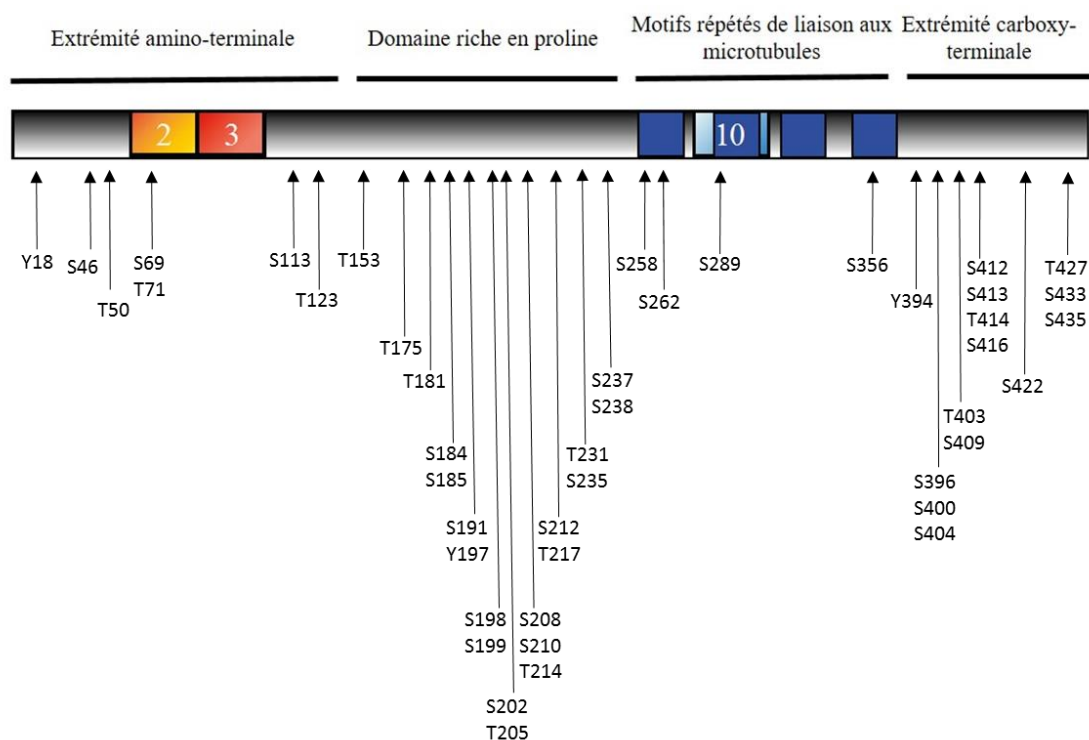


Figure 16 – Position des sites de phosphorylation de la protéine Tau extraite de cerveau Alzheimer. Environ 45 sites de phosphorylation ont été identifiés. Ils sont localisés principalement dans le domaine riche en proline et dans les régions entourant les domaines de liaison aux microtubules (adapté de Noble et al., 2013)

4 Hyperphosphorylation et agrégation de la protéine Tau, un lien de causalité ?

L'hyperphosphorylation de Tau est-il la cause de son agrégation ou est-ce deux mécanismes pathologiques indépendants ? L'existence d'une relation causale est toujours controversée. Grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques de formes phosphorylées de Tau et le marquage des agrégats par des méthodes d'imprégnation argentique, il a été mis en évidence que l'hyperphosphorylation de Tau précède la formation de DNF (Baner et al., 1991; Braak et al., 1994). Par ailleurs, les cerveaux de patients atteints de tauopathie et ceux issus de modèles

transgéniques de tauopathie présentent des agrégats de Tau systématiquement hyperphosphorylés. Une étude a mis en évidence la capacité de la protéine Tau recombinante hyperphosphorylée *in vitro* à s'agréger et former des PHF. Elle montre également le rôle inhibiteur des extrémités N-terminales et C-terminales vis-à-vis de l'agrégation appuyant ainsi le modèle d'une conformation protectrice en trombone ou en « S » (Alonso et al., 2001). L'équipe de E. Mandelkow a mis à profit l'hyperphosphorylation de Tau observée lorsque celle-ci est exprimée dans les cellules d'insectes Sf9. Une fois cette Tau purifiée, l'effet de l'hyperphosphorylation sur l'agrégation de Tau a été testé. Il ressort de ce travail que l'hyperphosphorylation promeut l'oligomérisation de Tau mais n'induit la formation que de très peu de fibrilles. L'hyperphosphorylation, à elle seule, ne permettrait pas la fibrillogénèse. D'autres éléments telles qu'une augmentation de la concentration de Tau ou l'ajout de polyanions serait nécessaire à son agrégation (Tepper et al., 2014). Or, dans un contexte pathologique, l'hyperphosphorylation induit le détachement de Tau des microtubules et pourrait tendre à augmenter localement la concentration de protéine Tau (Li et al., 2004). De plus, l'action de phosphatases sur des PHF extraits à partir de cerveaux de patients Alzheimer conduit à leur dissociation (Wang et al., 1995). Ces études ont conduit à l'émergence d'un modèle dans lequel l'hyperphosphorylation neutralise les charges positives inhibitrices localisées au niveau des domaines de liaison aux microtubules facilitant les interactions entre protéines Tau, leur oligomérisation et *in fine* la formation de fibrilles.

Néanmoins, ce modèle est sujet à débats. En effet, l'hyperphosphorylation ne conduit pas forcément à l'agrégation de la protéine Tau. Au cours du développement, l'isoforme fœtale de Tau se trouve être physiologiquement hyperphosphorylée (Kenessey and Yen, 1993; Matsuo et al., 1994). De la même manière, l'hyperphosphorylation de Tau apparaît transitoirement au cours de l'hibernation (Arendt et al., 2003). Pourtant, cette hyperphosphorylation n'est pas accompagnée par l'agrégation de Tau.

Une étude, grâce à l'utilisation de mutants phospho-mimétiques, suggère que l'effet de la phosphorylation sur l'agrégation de Tau dépend du site de phosphorylation considéré (Haase et al., 2004).

Il apparaît donc que l'hyperphosphorylation joue un rôle promoteur de l'agrégation de Tau et qu'elle doit probablement agir de concert avec d'autres événements cellulaires tels que la troncation, la nitration ou l'acétylation (Fig. 17) (Cohen et al., 2011; Lee and Shea, 2012; Mair et al., 2016).

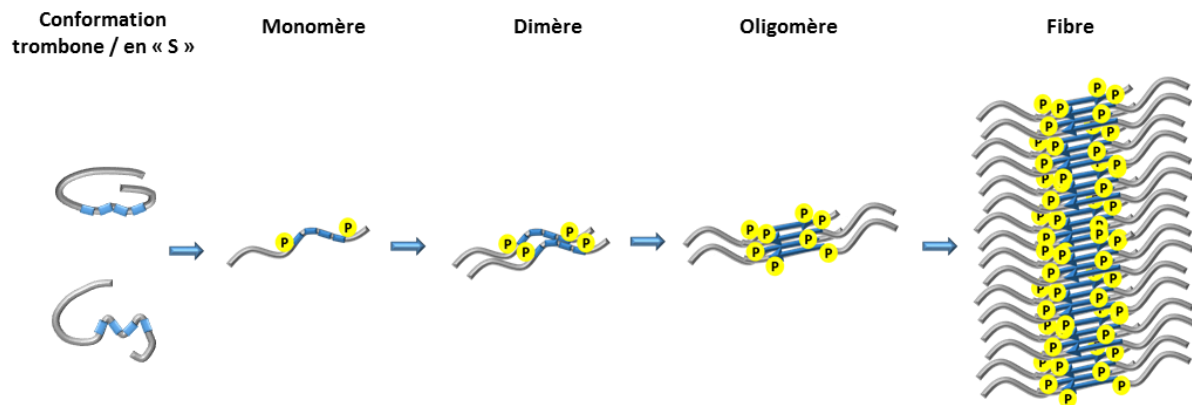


Figure 17 – Modèle de fibrillogénèse de la protéine Tau sous l’effet de l’hyperphosphorylation. Sous l’effet de l’hyperphosphorylation, la conformation en trombone ou en « S » est déstabilisée, Tau se détache du microtubule et adopte une conformation prone à l’agrégation. Les motifs VQIINK et VQIVYK sont démasqués et l’oligomérisation s’enclenche résultant à terme à la formation de fibres insolubles.

5 Rôle du stress oxydant dans les mécanismes d’oligomérisation de la protéine Tau

La découverte de dommages oxydatifs dans les cerveaux de patients atteints de tauopathies, particulièrement aux stades MCI, suggère que le stress oxydant serait un évènement précoce impliqué dans la pathologie. En conséquence, s’est posée la question d’une participation du stress oxydant aux processus d’agrégation de la protéine Tau. Le stress oxydant produit des effets disparates sur la phosphorylation. En effet, certaines études montrent que le SO promeut la phosphorylation de Tau (Olivieri et al., 2000; Su et al., 2010) quand d’autres travaux mettent en évidence une déphosphorylation (Davis et al., 1997; Egaña et al., 2003). *In vivo*, a été mis en évidence chez des souris transgéniques modèle de SO une augmentation de la phosphorylation de Tau (Melov et al., 2007). Cette variabilité peut s’expliquer par la diversité des modèles expérimentaux (Olivieri et al., 2001). Il est intéressant de noter qu’il a été rapporté une potentialisation de l’hyperphosphorylation de Tau après la déphosphorylation induite par un stress hyperthermique, inducteur de stress oxydant (Bruskov et al., 2002; Flanagan et al., 1998; Papasozomenos, 1996). De plus, le produit de l’oxydation d’acides gras polyinsaturés induit l’hyperphosphorylation de Tau (Liu et al., 2005b). P38MAPK et GSK3 pourrait être impliqué dans cette hyperphosphorylation induite par le SO (Goedert et al., 1997; Lovell et al.,

2004). D'ailleurs ces produits du SO stimulent la polymérisation de Tau *in vitro* (Gamblin et al., 2000; Pérez et al., 2000).

L'agrégation de Tau constitue un mécanisme pathologique commun à toutes les tauopathies qui peut être induit par des phénomènes d'hyperphosphorylation et de stress oxydant. Cette similitude entre les différentes tauopathies suggère un rôle central de l'agrégation dans la neurodégénération.

III. Retentissement physiopathologique de l'agrégation de Tau

La neurodégénération est corrélée à l'agrégation de Tau. Or, des modèles murins transgéniques nous indiquent que le lien qui unit ces deux processus n'est pas uniquement corrélatif. En effet, à titre d'exemple, la lignée PS19 exprimant une mutation pathologique du gène MAPT présente des DNF, une mort neuronale ainsi qu'une détérioration des capacités mnésiques (Takeuchi et al., 2011; Yoshiyama et al., 2007). Afin de comprendre ce processus neurodégénératif qui a cours dans les tauopathies, nous devons nous intéresser aux conséquences de cette agrégation sur la fonctionnalité de Tau et la vie neuronale. Différents dysfonctionnements ont pu être identifiés durant la pathologie Tau dont nous verrons quelques exemples dans cette partie. Deux modèles non-exclusifs co-habitent et sont nés du questionnement suivant : l'effet délétère des agrégats provient-elle d'une perte de la fonction de Tau, piégée au sein des agrégats ou le processus agrégatif confère-t-il en soi un caractère toxique à Tau ?

1 Un gain de fonction toxique

D'après les modèles KO Tau, l'absence de Tau ne suffit pas pour affecter la viabilité des souris suggérant que la toxicité de Tau est dû, au moins en partie, à un gain de fonction. Des études montrent qu'au cours du processus d'agrégation de Tau, des monomères de Tau évoluent en dimères, puis en petits oligomères solubles jusqu'à l'obtention d'agrégats insolubles de Tau qui s'organiseront en PHF puis en DNF (pour revue, Cowan and Mudher, 2013). Cependant, une question demeure : parmi toutes ces espèces de Tau, lesquelles sont délétères pour le neurone ? Par la suite, nous nous intéresserons dans cette partie au caractère

propagateur de la pathologie Tau ainsi qu'à l'impact de cette pathologie sur le métabolisme des ARN.

a Agrégat ou oligomères ? Quelle est la forme toxique ?

Parce que la présence de DNF dans la MA est corrélée avec le déclin cognitif, ces agrégats insolubles ont été mis en cause dans la neurodégénération. Pourtant, de plus en plus d'études remettent en question cette théorie et indiquent que les DNF ne sont pas responsables de la mort neuronale massive observée. Gomez-Isla et collaborateurs montrent que si la présence de DNF dans la MA est corrélée à la perte neuronale, la quantité de mort neuronale est bien supérieure à la quantité de DNF. En d'autres termes, certains neurones meurent sans développer des DNF (Gómez-Isla et al., 1997). De plus, les neurones arborant des DNF peuvent survivre plusieurs décennies (Morsch et al., 1999). Ces données sont confirmées par les modèles transgéniques de tauopathie. Dans un modèle de tauopathie chez la drosophile, une claire neurodégénération se produit en l'absence de DNF (Wittmann et al., 2001). Concernant les modèles murins pathologiques, il a été notamment confirmé que la dégénérescence synaptique précède la formation de DNF (Yoshiyama et al., 2007). De manière intéressante, dans des souris transgéniques dont l'expression du transgène Tau pathologique peut être éteint, cette extinction permet de rétablir les performances mnésiques sans modifier l'accumulation de DNF (Van der Jeugd et al., 2012; Santacruz et al., 2005). L'ensemble de ces travaux indiquent que les DNF ne sont pas les promoteurs exclusifs de la neurotoxicité de Tau.

Il apparaît ainsi que les formes de Tau responsables de la dysfonction neuronale correspondent à des stades préfibrillaires, antérieurs à la formation des DNF. A la lumière d'un nombre croissant d'études, les oligomères solubles s'avèrent être des espèces toxiques de Tau. L'effet délétère de ces oligomères a pu être démontré dans des lignées cellulaires de neuroblastome SH-SY5Y (Flach et al., 2012; Lasagna-Reeves et al., 2010; Tian et al., 2013). De plus, l'injection d'oligomères de Tau dans l'hippocampe de souris induit une neurotoxicité accompagnée de troubles mnésiques contrairement à l'injection de monomères ou de fibrilles (Lasagna-Reeves et al., 2011).

Chez les patients atteints de MA, les oligomères sont localisés dans des neurones aux stades précoces de la pathologie (Lasagna-Reeves et al., 2012a; Maeda et al., 2007; Patterson et al., 2011). Ces espèces ne sont pas spécifiques de la MA et leur présence est attestée dans d'autres tauopathies telles que la CBD et la PSP (Gerson et al., 2014; Ward et al., 2013).

Toutefois, la nature des oligomères reste mal caractérisée et constitue un obstacle à l'interprétation et la comparaison de ces travaux. Au cours de ce travail de thèse nous avons utilisé deux anticorps spécifiques des oligomères : TOC1 et T22, aimablement fournis par le Dr. Lester Binder (Michigan State University) et le Dr. Rakez Kaye (University of Texas). TOC1 reconnaît spécifiquement les dimères et les oligomères de Tau (Patterson et al., 2011). T22 est spécifique des oligomères de Tau, particulièrement les dimères et les trimères (Lasagna-Reeves et al., 2012a). En revanche, aucun de ces deux anticorps ne reconnaît les monomères et les fibres de Tau.

Contrairement aux PHF, le pool de Tau solubles et hyperphosphorylés séquestre la protéine Tau normale altérant en conséquence la polymérisation microtubulaire (Alonso et al., 2006). Cette étude suggère que les DNF sont inertes et constitueraient une réponse défensive cellulaire face aux espèces toxiques solubles de Tau. Ainsi, les DNF piègeraient ces formes toxiques et protégeraient les neurones de leurs effets délétères. En cohérence avec cette hypothèse, la présence de dommages oxydatifs transitoires, réversibles et rapidement dégradables tel que l'adduit 8-OHG décroît avec l'abondance des DNF (Nunomura et al., 2001). Ainsi, les neurones pourvus de DNF présentent peu de dommages de type 8-OHG au regard de l'accumulation des produits de glycosylation avancés (Lüth et al., 2005). Ces derniers correspondent à des dommages oxydatifs stables et témoignent de l'historique oxydatif du neurone. A long-terme, la protection conférée par les DNF pourrait devenir délétère, encombrer l'espace cytoplasmique, séquestrer des facteurs moléculaires et interférer avec différents processus cellulaires. En 2011, C.J. Carter qualifie élégamment la DNF « du cimetière d'une victoire à la Pyrrhus » (Carter, 2011).

b Propagation de la pathologie Tau

En 1982, S.B. Prusiner purifie la fraction infectieuse de la tremblante du mouton. Il observe que cet agent résiste aux méthodes d'inactivation ciblant les acides nucléiques tandis qu'il s'avère être sensible aux procédés visant à détériorer les protéines. Il suggère alors que l'agent infectieux est une protéine (Prusiner, 1982). De vives controverses résultèrent de cette découverte car elle se heurte au dogme selon lequel les maladies se propagent au travers d'organismes disposant d'acides nucléiques nécessaires à leur réplication. Le concept de prion était né, un terme issu de « PROteinaceous INfectious particle ».

Parce que la protéine Tau acquiert la capacité de convertir des protéines Tau normales en fibres (Alonso et al., 1996) et que la pathologie progresse de façon stéréotypée à travers des régions synaptiquement connectées, il a été proposé que Tau puisse agir à la manière d'un prion. Ainsi, les tauopathies seraient la conséquence d'une conformation toxique de Tau qui se transmettrait à d'autres protéines Tau normales et se propagerait de neurone à neurone.

Dans des lignées cellulaires, il a été montré que des agrégats de protéines Tau extra-cellulaires peuvent entrer dans la cellule et induire l'agrégation de la protéine Tau intra-cellulaire. Cette étude met également en évidence le transfert d'agrégats intra-cellulaires vers d'autres cellules en co-culture (Frost et al., 2009). En 2009, Clavaguera et collaborateurs injectent un lysat de cerveau de souris transgénique P301S contenant un cocktail d'espèces de Tau solubles, hyperphosphorylées et d'agrégats au sein de l'hippocampe de souris Alz17. Ces souris expriment la Tau sauvage humaine sans toutefois développer une pathologie Tau. Suite à cette injection, la Tau sauvage humaine s'agrège. D'ailleurs, cette agrégation n'est pas circonscrite au site d'injection puisqu'elle se propage dans les régions voisines ainsi que dans des zones éloignées et connectées synaptiquement (Clavaguera et al., 2009). Cette propagation de la pathologie Tau a pu être confirmée par d'autres études menées *in vivo*, par l'injection de lysats de cerveaux atteints de différentes tauopathies, de fibres purifiées de Tau ou d'oligomères de Tau purifiés à partir de cerveaux de patients Alzheimer (Clavaguera et al., 2013; Iba et al., 2013; Lasagna-Reeves et al., 2012b). Dans un modèle de souris dont l'expression du transgène Tau P301L est restreint au cortex entorhinal, on observe une co-agrégation de la Tau humaine avec la Tau endogène ainsi qu'une propagation de la pathologie suivant la structure des circuits neuronaux (de Calignon et al., 2012). Par stratégie lentivirale, dans un modèle de rat sauvage, Dujardin et collaborateurs ont démontré l'existence d'une propagation trans-synaptique de Tau (Dujardin et al., 2014b).

A la lumière de ces travaux, il apparaît que la protéine Tau mal-conformée, pathologique, adopte un comportement de type prion. Cependant, s'il en partage certaines caractéristiques, il ne répond pas strictement à tous les critères de la définition actuelle du prion (Wegmann et al., 2015). Il apparaît, d'après les travaux de Wegmann et collaborateurs, que le mode de propagation et le comportement toxique de Tau diffèrent de la protéine prion PrP. En effet, la délétion du gène codant la protéine prion PrP est neuroprotectrice : la protéine prion toxique PrP dite scrapie ne peut se propager au sein des neurones invalidés pour ce gène et conduire à leur dégénérescence. La forme toxique de Tau dite P301L est, quant à elle, capable de se propager et d'induire une toxicité dans les neurones n'exprimant pas la protéine Tau.

c Un exemple de gain de fonction toxique : la dysfonction du transport axonal

Différents mécanismes moléculaires pourraient être impliqués dans la toxicité de Tau parmi lesquels une dérégulation du transport axonal. Le transport axonal est essentiel pour le bon fonctionnement du neurone qui dispose de longues neurites. Une altération du transport antérograde a été mise en évidence dans des modèles de souris transgéniques développant une pathologie Tau (Ittner et al., 2008). Cet effet pourrait résulter de l'activation de la voie PP1-GSK3 β par des agrégats de Tau. Elle conduirait à la libération du cargo par la kinésine (Kanaan et al., 2011). Le transport axonal permet notamment le mouvement des mitochondries le long des microtubules dans les axones. Ces mitochondries jouent un rôle vital au sein du neurone, cellule énergivore et sensible à l'excitotoxicité. Dans un modèle de lignée cellulaire, la sur-expression de Tau inhibe le trafic des mitochondries du soma vers la périphérie cellulaire (Ebner et al., 1998). Or, une étude a mis en évidence une altération de la localisation des mitochondries dans des cerveaux de souris transgéniques développant une pathologie Tau ainsi que dans le cortex de patients Alzheimer. Les auteurs suggèrent une implication des formes solubles de Tau dans ce dysfonctionnement (Kopeikina et al., 2011). Ainsi, Tau apparaît être impliqué dans la redistribution pathologique des mitochondries vers le soma. Il en résulterait une altération de l'accès des acteurs synaptiques à l'ATP et contribuerait à la perte synaptique.

d Une perturbation du métabolisme des ARN ?

A l'image du rôle physiologique de Tau vis-à-vis des ARN, peu de choses sont connues sur l'effet de la pathologie sur le métabolisme des ARN. L'équipe du Dr. Wolozin et du Dr. Abisambra ont ouvert un nouveau champ d'étude qui vise à comprendre les liens qui unissent les ARN et la pathologie Tau. À partir des fractions microsomiales obtenues de cerveaux de sujets contrôle et de patients Alzheimer, Tau a été co-immunoprécipité. Parmi les protéines identifiées par spectrométrie de masse, les protéines participant à la traduction des ARN sont particulièrement représentées. Les auteurs ont ainsi mis en évidence qu'une partie de ces partenaires sont distincts ou interagissent différemment entre les sujets contrôles et Alzheimer. Ce résultat suggère que la pathologie Tau altère la fonction ribosomale (Meier et al., 2015). Ce même groupe a montré que Tau interagit davantage avec les ribosomes dans les cerveaux Alzheimer et que cette interaction inhibe la traduction protéique (Meier et al., 2016). Cet impact

sur la traduction pourrait participer à la neurodégénération, d'autant que la synthèse protéique est un mécanisme critique dans les mécanismes mnésiques (Duvarci et al., 2008). Ces travaux confirment la diminution de la synthèse protéique observée dès les stades précoces de la maladie d'Alzheimer (Ding et al., 2005). Par ailleurs, de nombreux microARN ont leur expression dérégulée au cours de la maladie d'Alzheimer, notamment le miR-132 dont l'expression est diminuée dans les neurones présentant une Tau hyperphosphorylée (Lau et al., 2013). Récemment, la déficience de ce miR-132 a été impliquée dans la promotion de l'agrégation de Tau (Smith et al., 2015).

De manière intéressante, il a été mis en évidence une co-localisation de la pathologie Tau et des granules de stress (GS) des structures riches en ARN et en protéines de liaison aux ARN (Vanderweyde et al., 2012). Si Tau promeut la formation des GS, il apparaît réciproquement que les GS sont impliqués dans l'agrégation de Tau. L'expression de la Tau mutée P301L ralentit la formation des GS et augmente leur taille, suggérant un impact délétère de la pathologie dans le fonctionnement des GS (Vanderweyde et al., 2016).

2 Une perte de fonction

Une seconde hypothèse considère que la neurodégénération résulte d'une perte de fonction de Tau. Ainsi, l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau conduirait à diminuer le pool de protéines Tau « fonctionnelles » et, par voie de conséquence, à la mort neuronale. Controversée, la principale critique de ce modèle est l'absence d'impact de la délétion de Tau sur la viabilité des souris. Cependant, celle-ci serait en partie expliquée par des mécanismes de compensations. En effet, quelle que soit la fonction de Tau considérée, celle-ci fut souvent controversée compte tenu de l'absence fréquente de phénotype marqué chez les souris KO (Harada et al., 1994). Qui plus est, certains phénotypes associés aux modèles murins déficients en Tau semblent dépendre de la lignée de souris KO Tau étudiée (Dawson et al., 2001; Harada et al., 1994). Néanmoins, ces études ont pu mettre en lumière l'existence de mécanismes de compensation, de redondance fonctionnelle entre les différentes MAP.

En effet, une augmentation de l'expression de MAP1A, MAP1B, MAP2 a été mise en évidence chez différents modèles de KO-Tau suggérant un système de compensation (Dawson et al., 2001; Harada et al., 1994; Ma et al., 2014). En effet, lorsque les souris KO-Tau générées par Harada et collaborateurs sont croisées avec des souris KO-MAP1B, l'altération de la maturation neuronale est notamment exacerbée (Takei et al., 2000). Cette redondance

fonctionnelle constitue donc une difficulté dans l'étude des fonctions de Tau. L'utilisation de modèle KO-Tau conditionnel pourrait s'avérer intéressant afin de s'affranchir de cet obstacle.

Néanmoins, l'étude des modèles KO-Tau constitutifs a mis en évidence l'implication de Tau dans la plasticité synaptique ou la protection des acides nucléiques. Dans ce contexte, la pathologie Tau pourrait empêcher Tau de mener à bien ses rôles.

a La pathologie Tau et les microtubules

De toutes les fonctions de Tau, la stabilisation et la polymérisation des microtubules sont les plus connues. Au sein des DNF, Tau ne se lie plus à la tubuline et est inerte vis-à-vis des microtubules (Iqbal et al., 1994). Similairement, la protéine Tau soluble hyperphosphorylée, n'interagit plus avec la tubuline et provoque, à terme, la rupture des microtubules via la séquestration de la protéine Tau normale ainsi que d'autres MAP (Alonso et al., 1994; Li et al., 2007). De plus, dans des modèles de souris transgéniques développant une pathologie Tau, une diminution de la densité des microtubules a pu être observée (Ishihara et al., 1999). Cette altération de la densité microtubulaire est corrigée par le traitement de ces souris avec du paclitaxel, un composé stabilisateur des microtubules (Zhang et al., 2005). Cette étude suggère que la rupture des microtubules au cours de la pathologie est le résultat d'une perte de fonction stabilisatrice de Tau. Celle-ci pourrait provoquer la dégénérescence neuronale.

b La pathologie Tau et la synapse

Dans un modèle de souris KO-Tau, l'expression des MAP, associées aux mécanismes compensatoires de l'absence de Tau, diminue chez les individus âgés. Cette diminution est corrélée avec l'apparition d'un déficit mnésique associé à une perte synaptique hippocampique (Ma et al., 2014). Cette étude suggère que les MAP masquent l'effet de l'absence de Tau sur le fonctionnement synaptique. Récemment, des travaux menés par Tracy et collaborateurs indiquent que l'acétylation anormale de Tau, observée chez des patients Alzheimer, altère la plasticité synaptique. Ils montrent également une diminution de l'affinité de Tau acétylé vis-à-vis de l'actine. Cette perte d'interaction pourrait altérer la dynamique de la polymérisation de l'actine impliquée dans le mécanisme de LTP (Tracy et al., 2016).

c La pathologie Tau et les acides nucléiques

Peu de choses sont connues concernant l'effet de la pathologie Tau sur les acides nucléiques. Des dommages oxydatifs aux ARN et à l'ADN ont pu être décrits à des stades précoces de la pathologie Alzheimer suggérant un rôle de ces dommages dans la pathogénèse (Lovell and Markesbery, 2007; Nunomura et al., 2001; Wang et al., 2006a). De plus, des aberrations chromosomiques ont été observées dans des fibroblastes de patients porteurs de la mutation pathologique Tau P301L (Rossi et al., 2008, 2013). Ainsi la pathologie Tau pourrait altérer sa fonction protectrice vis-à-vis des acides nucléiques. Des études réalisées *in vitro* ont mis en évidence la perte d'interaction de l'ADN avec Tau lorsque celle-ci est phosphorylée (Camero et al., 2014a; Hua and He, 2002; Lu et al., 2013b; Qi et al., 2015). De manière intéressante, il a été montré *in vitro* que la protéine Tau phosphorylée perd sa capacité à protéger l'ADN de la dénaturation thermique ainsi que des attaques oxydatives (Lu et al., 2013b). Cependant, aucune étude à ce jour n'a montré, à ce jour, l'impact de la pathologie Tau sur l'intégrité des acides nucléiques *in vivo*. Ce point constitue la première partie de ce travail de thèse (cf. étude 1).

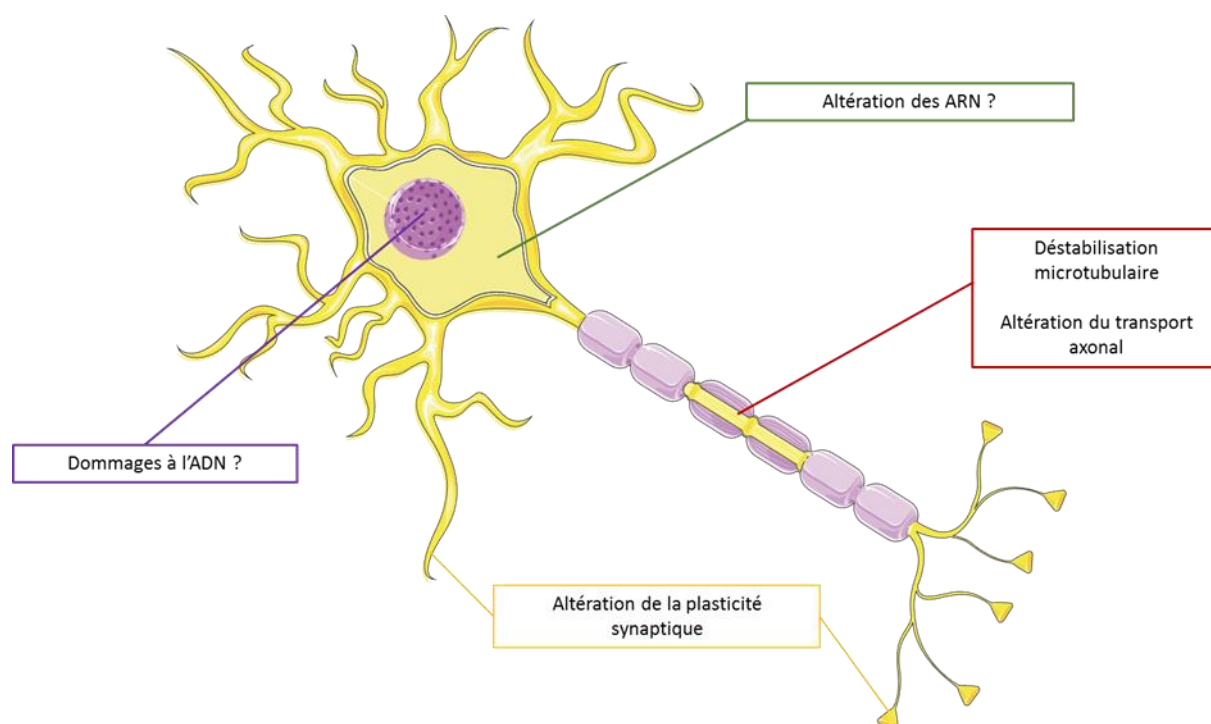


Figure 18 – Conséquences de la perte de fonction ou du gain de fonction pathologique de Tau. L'hyperphosphorylation de Tau induit son détachement des microtubules. Il en résulte une

déstabilisation du réseau microtubulaire ainsi qu'une altération du transport axonal. La pathologie Tau peut également affecter le rôle de Tau à la membrane et altérer la plasticité synaptique. Nous avons récemment montré une implication de Tau dans le maintien de l'intégrité neuronale. La pathologie Tau pourrait prévenir, affecter cette capacité et induire des dommages aux acides nucléiques.

L'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau constitue un mécanisme pathologique, qualifié de « pathologie Tau », commun à un certain nombre de maladies neurodégénératives. Dans ce décor, le stress oxydant semble jouer un rôle déterminant dans cette pathologie Tau. Ce phénomène de pathologie Tau va conduire le neurone à dégénérer. Pendant de nombreuses années les agrégats insolubles de Tau ont été désignés comme la cause de cette toxicité. Récemment, un faisceau d'études pointent les oligomères solubles de Tau comme les responsables de la toxicité plutôt que les agrégats. Au vu des multiples fonctions de Tau, les hypothèses sont nombreuses quant à la nature de cette toxicité.

Au sein du laboratoire, une fonction protectrice de Tau vis-à-vis de l'ADN a été mise en évidence dans des cultures primaires de neurones corticaux de souris (Sultan et al., 2011). Dès lors, l'objectif fut de confirmer l'existence de cette fonction atypique pour une MAP dans un contexte plus physiologique, *in vivo*, dans des cerveaux de souris. De manière inattendue, il ressort de ce travail que Tau, dans les neurones, participe non seulement au maintien de l'intégrité de l'ADN mais également à celle de l'ARN (Violet et al., 2014). En conséquence, nous nous sommes intéressés aux liens qu'entretient Tau avec les ARN. En effet, si Tau se lie à l'ARN (Wang et al., 2006b), si Tau interagit avec des protéines impliquées dans la traduction et le processing des ARN (Gunawardana et al., 2015), la fonction de Tau dans le métabolisme des ARN demeure pourtant obscure. Afin de préciser ce rôle, nous avons identifié de nouveaux partenaires moléculaires de Tau impliqués dans le métabolisme des ARN. Parmi ces partenaires, se trouve une hélicase à ARN : DDX6.

Chapitre 2 : Structure & Rôle de l'hélicase DDX6

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons dans un premier temps à la structure de DDX6. Puis, nous décrirons brièvement les voies du métabolisme des ARN dans lesquelles est impliquée DDX6.

A. Généralités autour de DDX6, une hélicase à boîte DEAD

Chez l'Homme, le gène RCK fut initialement identifié comme la cible d'un point de rupture d'une translocation observée dans une lignée cellulaire de lymphome à cellules B (RC-K8) (Akao et al., 1991). Codant une protéine d'une masse moléculaire apparente de 54kDa composée de 473 acides aminés, elle prit le nom de RCK/P54 chez l'Homme (Akao et al., 1992, 1995; Matsui et al., 2004). L'analyse comparative de sa séquence mis alors en évidence huit motifs consensus caractéristiques des hélicases ARN à boîtes DEAD (Akao et al., 1995). Hautement conservée, différents orthologues ont été identifiés au sein de modèles expérimentaux tels que ME31B chez *Drosophila Melanogaster* (67,5% d'homologie), DHH1 chez *Sacharomyces Cerevisiae* (63,9% d'homologie), CGH-1 chez *Caenorhabditis elegans* (69,2% d'homologie), XP54 chez *Xenopus laevis* (94,4% d'homologie), RCK/P54 chez *Mus Musculus* (97,7% d'homologie) (Ostareck et al., 2014). Cependant, chez les mammifères, cette protéine est généralement désignée sous le terme DDX6, DEAD-Box protein 6.

I. Introduction aux protéines à boîte DEAD

En 1976, une enzyme capable de « dérouler », c'est à dire séparer les brins d'ADN appariés de manière ATP-dépendante est découverte chez *E. Coli* (Abdel-Monem et al., 1976). Il s'agit de la première description d'une hélicase à ADN. Par la suite, d'autres hélicases furent identifiées dans les autres règnes du vivant. En 1988, deux groupes mettent en évidence concomitamment l'existence de motifs conservés au sein de ces hélicases à ADN. De manière surprenante, ils montrent que ces motifs se trouvent être également présents dans des protéines rétrovirales. En conséquence, les auteurs proposent l'existence d'hélicase à ARN (Gorbalenya et al., 1988; Hodgman, 1988). Rapidement, l'activité hélicase à ARN de deux protéines : p68 et le facteur d'initiation de la traduction eIF4a est démontrée *in vitro* (Hirling et al., 1989; Rozen et al., 1990). Or, d'autres protéines partagent avec eIF4a et p68 les mêmes motifs parmi lesquels la séquence « acide aspartique – acide glutamique – alanine – acide aspartique » désignée D-E-

A-D d'après le code international des acides aminés. Cette particularité donne alors naissance à la famille des hélicases à boîte DEAD (Linder et al., 1989). Ainsi, selon leur séquence primaire d'acides aminés, les hélicases se classent en six superfamilles elles-mêmes subdivisées en familles. Les hélicases des superfamilles 3, 4, 5, et 6 forment des structures toroïdales, généralement hexamériques tandis que les superfamilles 1 et 2 ne forment pas de structures en anneau. La classe des hélicases ARN à boîte DEAD constitue la famille la plus représentée de la superfamille 2. L'étude de ces hélicases à ARN montre que leur activité ne se limite pas à dérouler les structures d'ARN appariées, elles modifient également la conformation tridimensionnelle de l'ARN, remodelent ou forment des points de nucléation pour la formation de complexes ribonucléoprotéiques. L'énergie nécessaire à ces réactions est fournie par l'hydrolyse de nucleoside triphosphate. Ainsi, elles sont impliquées dans tous les aspects essentiels au métabolisme des ARN : transcription, traduction, épissage, biogénèse du ribosome, transport d'ARN, régulation de l'expression génique ou dégradation des ARN.

II. Structure des hélicases à boîte DEAD

La séquence et la position de motifs hautement conservés constituent la « signature » des hélicases à boîte DEAD. Il s'agit des motifs Q, I, Ia, Ib, GG, II, III, IV, GxxR, V et VI (Caruthers et al., 2000; de la Cruz et al., 1999; Linder et al., 1989; Tanner et al., 2003). A l'instar des autres hélicases de la superfamille 2, des études structurales par cristallographie révèlent que les hélicases à boîte DEAD sont construites autour d'un cœur hélicase composé de deux domaines globulaires dénommés Domaine 1 et Domaine 2 (Fig. 19B). Ces derniers présentent une homologie structurale avec la protéine bactérienne recombinaise A et sont liés entre eux par une séquence d'acides aminés flexible (Subramanya et al., 1996). Le Domaine 1 s'articule autour des motifs Q, Ia, GG, Ib, II et III tandis que le Domaine 2 est composé des motifs IV, QxxR, V et VI. Des études structurales et la génération de mutants menées sur diverses hélicases à boîte DEAD modèles telles que eIF4A, p68, UAP56, Vasa ou encore Ded1 ont permis de mieux appréhender le rôle de ces motifs conservés.

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

Le motif Q (GxFExPSPIQ), localisé dans la partie amino-terminale, forme des liaisons hydrogènes avec l'adénine. De cette façon, il apparaît que la spécificité de DDX6 pour l'ATP soit conférée par ce motif (Tanner et al., 2003).

Les motifs I (AKNGTGKT/S) et II (DEAD) correspondent respectivement aux motifs de Walker A et B et se sont localisés dans le Domaine 1. Ce sont des structures tridimensionnelles conservées, présentes dans de nombreuses protéines interagissant avec l'ATP. Le motif de Walker A est également désigné P-loop pour « phosphate-binding loop ». De multiples liaisons hydrogènes se forment entre les atomes d'oxygène des groupements phosphates de l'ATP et les résidus glycine, lysine et thréonine à l'extrémité carboxy-terminale « GKT/S » du motif I. Par ailleurs, la thréonine et la sérine interagissent avec l'ion divalent Mg^{++} , cofacteur important de la réaction d'hydrolyse du nucléoside triphosphate (Caruthers and McKay, 2002; Shi et al., 2004).

Le domaine Walker B constitue le motif éponyme de la famille des hélicases à boîte DEAD. Son premier acide aminé constitutif, un résidu aspartate, interagit avec l'ion magnésium associé à l'ATP. Quant au second acide aminé, le glutamate, il interagit avec une molécule d'eau. De sorte que cette dernière cède un proton au glutamate, jouant le rôle de résidu catalytique. L'eau, ainsi activée, agit comme un composé nucléophile et « attaque » le groupement phosphate terminal de l'ATP conduisant à son hydrolyse (Cordin et al., 2006; Linder and Jankowsky, 2011; Orelle et al., 2003). De certaines mutations des motifs I et II résultent une altération voire une abolition de l'hydrolyse de l'ATP (Iost et al., 1999; Pause and Sonenberg, 1992).

Dans l'extrémité amino-terminale du Domaine 1, est localisé le motif III (SAT) impliqué dans le couplage de l'hydrolyse de l'ATP et de l'activité hélicase (Banroques et al., 2010; Pause et al., 1993).

Localisés au sein du Domaine 2, les motifs V (TRGID) et VI (LHRIGRSGR) interagissent avec l'ATP. Des mutations de ces motifs dans la protéine p68 abolissent l'hydrolyse de l'ATP (Lin et al., 2005). Il a été mis en évidence une implication des résidus arginine du domaine VI dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Pause et al., 1993; Rogers et al., 2002). Le second résidu arginine formerait une structure en « doigt d'arginine » qui stabiliserait le complexe Mg^{++}/ATP et faciliterait l'hydrolyse (Cordin et al., 2006). Une

implication du domaine V dans l'interaction avec l'ATP a été décrite dans des hélicases à ADN de la superfamille 1 ainsi que dans l'hélicase à boîte DEAD Vasa (Caruthers and McKay, 2002; Caruthers et al., 2000; Sengoku et al., 2006) (Fig. 19A).

2 Des motifs impliqués dans la liaison à l'ARN

A l'instar des motifs impliqués dans la liaison à l'ATP, l'interaction avec l'ARN des hélicases à boîte DEAD met en jeu également des motifs localisés sur les deux domaines. Les motifs Ia (PTRELALQ), GG, Ib (TPGR) dans le Domaine 1 et les motifs IV (IIF) et V (TRGID) dans le domaine 2 interviennent dans la liaison des hélicases à boîte DEAD avec l'ARN. Ces interactions sont principalement le fait de liaisons ioniques et de liaisons hydrogène (Andersen et al., 2006, Bono et al., 2006, Sengoku et al., 2006, Del Campo et al., 2009). DDX6 présente ainsi une forte affinité pour l'ARN ($K_d = 1 \text{ nM}$) avec lequel elle se lie de façon séquence non-spécifique (Ernoul-Lange et al., 2012) (Fig. 19A).

3 Aspects conformationnels

Constituée de deux domaines globulaires, la conformation tridimensionnelle des hélicases à boîte DEAD rappelle la forme d'un haltère. Ces deux domaines forment un sillon qui abrite le site de liaison à l'ATP tandis que la face opposée interagit avec l'ARN. Cette structure est flexible et sa conformation dépend de son interaction avec l'ARN ainsi que de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP. Selon les différents stades du cycle ATPase, l'hélicase alterne entre une conformation ouverte et fermée qui diffèrent par leurs affinités pour l'ARN. Dès lors, en absence d'ATP, les deux domaines s'éloignent et présentent une affinité moindre pour l'ARN tandis que celle-ci augmente lorsque les deux domaines se rapprochent sous l'effet de la liaison à l'ATP. Des interactions intra-moléculaires stabilisent cette conformation fermée. A titre d'exemple, les interactions entre les motifs II-III et III-VI formeraient le sillon nécessaire à la liaison à l'ATP et faciliteraient son hydrolyse (pour revues Andreou and Klostermeier, 2013; Cordin et al., 2006).

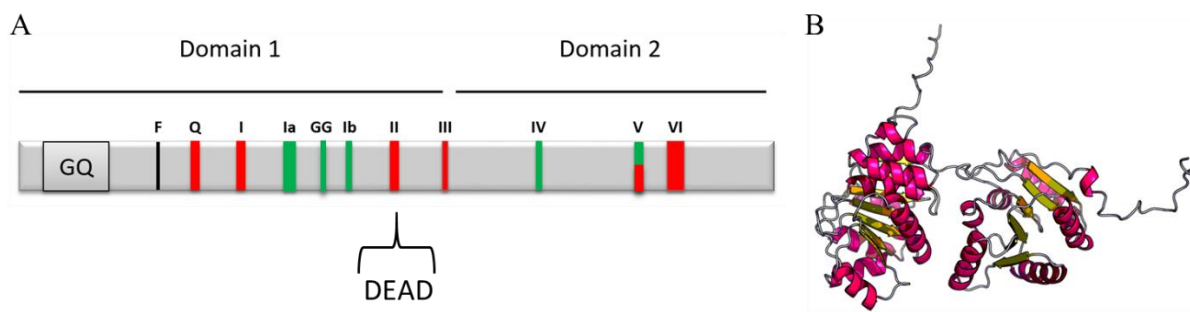


Figure 19 – Structure de la protéine DDX6. (A) Motifs conservés au sein de la protéine DDX6. Les boîtes vertes correspondent aux motifs impliqués dans la liaison à l'ARN. Les boîtes rouges correspondent aux motifs impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Le domaine V est impliqué dans l'interaction avec l'ATP et l'ARN. (B) Prédiction de structure de DDX6 réalisée à l'aide du serveur RaptorX. On observe, deux domaines globulaires correspondant aux deux domaines de DDX6 (Källberg et al., 2012)

4 D'autres domaines remarquables

L'analyse de la séquence en acides aminés de DDX6 met en lumière d'autres séquences remarquables.

L'extrémité amino-terminale de DDX6 comporte de nombreux résidus glutamine, glycine et asparagine. Les domaines riches en glutamine et asparagine (domaine Q/N) confèrent aux protéines une forte propension à l'auto-agrégation et la formation de fibrilles amyloïdes (Zhang et al., 2016). Une étude menée *in vitro* montre que si DDX6 ne s'auto-agrège pas sous forme de fibres, elle est en revanche capable de former des oligomères. Néanmoins cette oligomérisation n'est pas dépendante du domaine Q/N de DDX6 (Ernault-Lange et al., 2012). Un rôle de ces séquences dans la formation d'interactions intermoléculaires a également été proposé. D'ailleurs, des études suggèrent que ces domaines sont impliqués dans la localisation et la formation de granules ribonucléoprotéiques tels que les P bodies ou les granules de stress (Gilks et al., 2004; Reijns et al., 2008). Cependant, l'implication du domaine riche en glutamine de DDX6 dans la formation de ces granules demeure débattue (Ernault-Lange et al., 2012; Reijns et al., 2008). Nous reviendrons plus en longueur sur la fonction de DDX6 dans ces granules à la fin du chapitre 2.

Toujours au sein de l'extrémité amino-terminale, une séquence d'acides aminés basiques constituerait un signal de localisation nucléaire putatif tandis qu'un signal d'export nucléaire fonctionnel a été identifié entre le motif I et le motif Ia (Smillie and Sommerville, 2002).

III. Des hélicases non conventionnelles

A la différence des hélicases canoniques qui séparent les brins d'acides nucléiques appariés sous forme double-brin par translocation, les hélicases à boîte DEAD déroulent localement de courts duplex d'acide nucléique (Linder and Jankowsky, 2011). En outre, cette relaxation est bi-directionnelle, elle peut se faire dans le sens 5'-3' ou 3'-5' (Rozen et al., 1990). De plus, celles-ci se distinguent également par l'utilisation de l'ATP. En effet, au sein des hélicases canoniques, l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire au déroulement de l'acide nucléique double-brin tandis que seule la liaison de l'ATP aux hélicases à boîte DEAD est nécessaire à l'ouverture des duplex d'acides nucléiques. L'hydrolyse de l'ATP n'est requise qu'au recyclage de l'hélicase (Liu et al., 2008). Un comportement similaire a été rapporté pour DDX6. La relaxation de l'ARN nécessite la liaison de l'ATP à DDX6 et est indépendante de son hydrolyse (Ernoul-Lange et al., 2012).

IV. Localisation de DDX6

Le gène RCK est exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus humains et de souris (Akao et al., 1995). La présence de la protéine DDX6 est confirmée dans le cerveau, le foie, la rate, le rein, l'estomac, le colon, le testicule et les muscles squelettiques chez la souris et dans de nombreuses lignées cellulaires murines ou humaines (Akao et al., 2006, Nonhoff et al., 2007). DDX6 est également exprimée dans les neurones (Akao et al., 2006, Hillebrand et al., 2010, Nicklas et al., 2015). DDX6 est particulièrement abondante. A titre d'exemple, dans les cellules HeLa, la quantité est estimée à 7 molécules de DDX6 pour 1 molécule d'ARN (Ernoul-Lange et al., 2012). Dans un contexte davantage physiologique, au sein d'ovocytes de Xénope, ce ratio double pour atteindre 15 molécules de DDX6 pour une 1 molécule d'ARN (Smillie and Sommerville, 2002, Minshall et al., 2007, Ernoul-Lange et al., 2012).

A l'échelle subcellulaire, la localisation de DDX6 est complexe. En dépit d'une localisation majoritairement cytoplasmique, sa présence est attestée notamment dans le noyau d'ovocyte de Xénope ainsi que dans des neurones de souris (Akao et al., 1995; Nicklas et al., 2015; Smillie and Sommerville, 2002). Une étude menée dans des testicules de rats montre une association de DDX6 avec le nucléole et l'hétérochromatine. Les auteurs estiment entre 5 et 10% la proportion de DDX6 dans le compartiment nucléaire des cellules composant le testicule

(Kawahara et al., 2014). Au sein du cytoplasme, une distribution diffuse de DDX6 et sous forme de foci est observée (Nonhoff et al., 2007). Parmi ces structures, les P-bodies montrent un enrichissement en DDX6 d'un facteur 170 comparativement à son environnement cytoplasmique (Ernault-Lange et al., 2012).

Dans la prochaine partie de ce manuscrit sera discutée la fonction de DDX6, notamment au sein de ces structures organisées en foci. La conservation et l'ubiquité de l'hélicase DDX6 semble témoigner de son rôle crucial dans le métabolisme des ARN.

B. Fonctions de DDX6

L'acide ribonucléique messager ou ARNm est une copie transitoire d'un gène. Elle constitue l'intermédiaire entre le gène qui code l'information nécessaire à l'assemblage d'une protéine, et ladite synthèse protéique correspondant à la traduction de ce code. L'ARN messager est un polymère de ribonucléotides. En dépit de sa nature monocaténaire, l'ARN est soumis à des repliements lui conférant une structure tridimensionnelle complexe. On distingue schématiquement trois parties : une séquence codante, destinée à être traduite, flanquée de deux séquences non-traduites : la séquence non-traduite 5' (5'UTR) et la séquence non-traduite 3' (3'UTR) (Fig. 20).

Chez les eucaryotes, l'ARNm doit subir une série de modifications afin d'être pleinement fonctionnel. Ainsi, au cours de la transcription, une coiffe composée d'une guanosine méthylée en position N7 est ajoutée à l'extrémité 5' de l'ARNm. Ce nucléoside modifié est relié à l'ARNm par une liaison 5'-5' triphosphate. Ces modifications possèdent des rôles multiples. Elles constituent des zones d'arrimage dynamiques pour différents complexes protéiques. A ce titre, elles participent à la stabilisation, la protection de l'ARNm contre les attaques de nucléases et régulent son export vers le cytosol. Elles se trouvent être également d'une importance critique dans la régulation de la traduction de l'ARNm.



Figure 20 - Structure générale d'un ARNm eucaryote mature. Une coiffe composée d'une guanosine méthylée en position N7 est ajoutée à l'extrémité 5' de l'ARNm et constitue la coiffe 5'. L'extrémité 3' est composée d'une succession de nombreuses adénosines et forme la queue poly-A. La séquence codante est flanquée d'une région 3' non traduite (3'UTR) et d'une région 5' non traduite (5'UTR). Au sein de ces régions sont localisées des structures impliquées dans la régulation de la traduction, la stabilité de l'ARNm ou sa localisation subcellulaire.

Une fois transcrit, le sort d'un ARNm peut le conduire à emprunter différentes voies : l'activation de sa traduction, sa répression, son stockage ou encore sa dégradation. La régulation de cette cascade est fondamentale dans l'ensemble des phénomènes de la vie cellulaire. De manière intéressante, il ressort d'une étude réalisée dans des fibroblastes murins que l'abondance d'une protéine donnée serait davantage corrélée à l'efficacité de sa traduction plutôt qu'à la quantité d'ARNm correspondante. Ce travail souligne l'importance cruciale du contrôle de la traduction (Schwanhäusser et al., 2011).

A la lumière de la littérature, il apparaît que DDX6 et ses orthologues sont des acteurs de ce métabolisme des ARNm. Dans cette section nous nous attarderons donc sur certaines fonctions de DDX6 telles que la répression de la traduction, la dégradation des ARN ainsi que son implication dans la voie des microARN. Puis, nous discuterons du rôle de DDX6 au sein des P bodies et des granules de stress. En effet, de par leurs capacités à lier l'ARN et à modifier localement sa structure secondaire, il s'avère que les hélicases à boîte DEAD peuvent concourir au fonctionnement de ces larges structures ribonucléoprotéiques.

I. Rôle de DDX6 dans la régulation de la traduction

DDX6 est impliquée dans des mécanismes de répression de la traduction. En effet, dans des cellules HeLa déplétées en DDX6, une augmentation du taux de traduction a été mise en évidence par incorporation de méthionine radioactive (Chu and Rana, 2006). Une expérience

similaire a été réalisée dans des cellules sur-exprimant DHH1p, une protéine orthologue de DDX6. Sa sur-expression induit une diminution de la traduction générale de la cellule (Coller and Parker, 2005). Des expériences de tethering assay ont confirmé le rôle répresseur de DDX6 dans la traduction (Coller and Parker, 2005; Minshall et al., 2009). Cet effet est lié à une répression traductionnelle plutôt qu'à une modification de la stabilité de l'ARNm cible (Minshall et al., 2001). Des mutations des domaines I, II, III et VI conduisent à l'abolition de l'action répressive sur la traduction de DDX6. De plus, de manière surprenante, le domaine 2 seul est suffisant pour réprimer la traduction (Minshall et al., 2009).

1 Quelques mots sur le modèle canonique d'initiation de la traduction chez les eucaryotes

La traduction peut être divisée en quatre étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage. L'initiation peut être définie comme le processus au cours duquel s'assemble un complexe compétent pour l'élongation qui interagit avec le codon d'initiation de la traduction. Ce phénomène peut lui-même être subdivisé en différentes phases et c'est ce que nous allons développer dans cette partie.

a Formation du complexe de pré-initiation 43S et liaison à l'ARN

La région 5'UTR dispose de nombreuses structures secondaires qui empêchent la liaison du ribosome. Afin d'être traduit, l'ARNm nécessite l'action du complexe d'initiation de la traduction composé de la protéine de liaison à la coiffe 5', eIF4E, de la protéine d'échafaudage eIF4G, l'hélicase à boîte DEAD eIF4A ainsi que son co-facteur eIF4B. L'action de ce complexe permet de modifier la structure secondaire de la région 5'UTR et de la préparer à l'action et la liaison du complexe 43S à l'ARN. La protéine d'échafaudage eIF4G interagit avec la poly(A)-binding protein (PABP) qui lie la queue poly(A) de l'ARN. L'ensemble de ces facteurs eIF4A, eIF4E, eIF4G forme le complexe initiateur de la traduction eIF4F. Ces interactions conduisent au rapprochement de la queue poly(A) et de la coiffe 5'. Ainsi se forme une boucle fermée activatrice de la traduction. En parallèle de l'activation de l'ARNm, le complexe de pré-initiation 43S s'établit. Il est composé de la petite sous-unité du ribosome 40S, du complexe eIF2-GTP associé à l'ARNt initiateur ainsi qu'eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5. Le complexe

d'initiation de la traduction interagit avec le complexe 43S et permet son recrutement à l'ARN (Fig. 21).

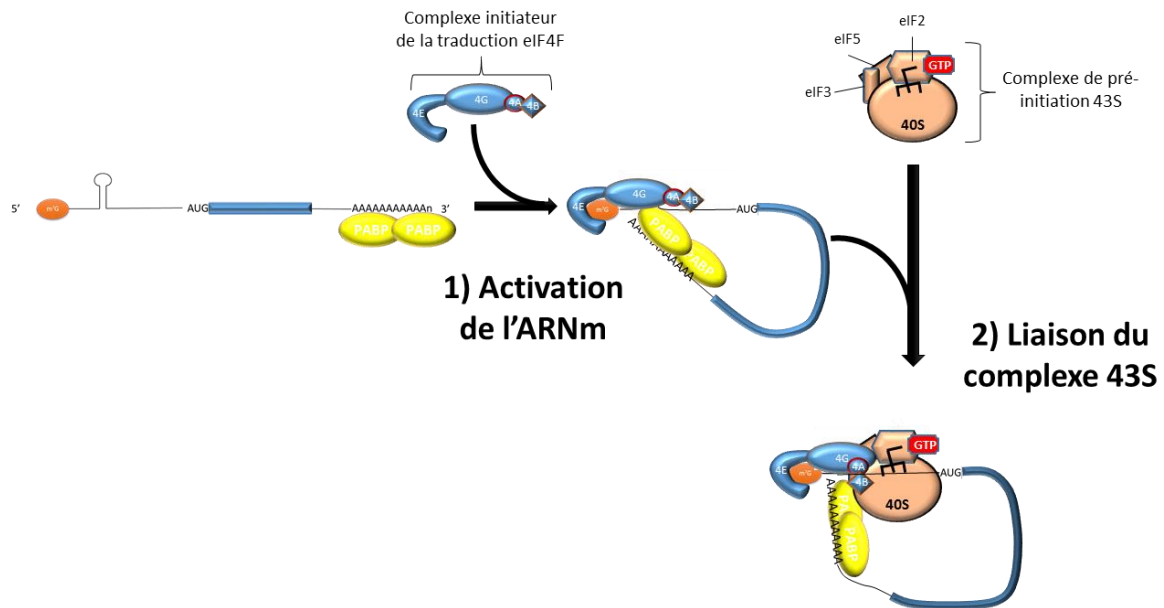


Figure 21 – Formation du complexe de pré-initiation 43S et liaison à l'ARN. Le complexe d'initiation de la traduction eIF4F se lie à l'extrémité 5' de l'ARNm et induit la formation d'une boucle fermée activatrice de la traduction. Le complexe de pré-initiation 43S de la traduction se forme en parallèle. Son recrutement à l'ARNm est permis par la liaison du complexe eIF4F au niveau de l'extrémité 5'. (Adapté de Jackson et al., 2010)

b Balayage de la région 5' non traduite

Le complexe 43S peut alors glisser le long de l'ARNm dans le sens 5'-3' jusqu'à ce que l'anti-codon de l'ARNt initiateur reconnaisse le codon d'initiation de la traduction. On parle alors de complexe 48S (Fig. 22).

3) Balayage de la région 5' non traduite

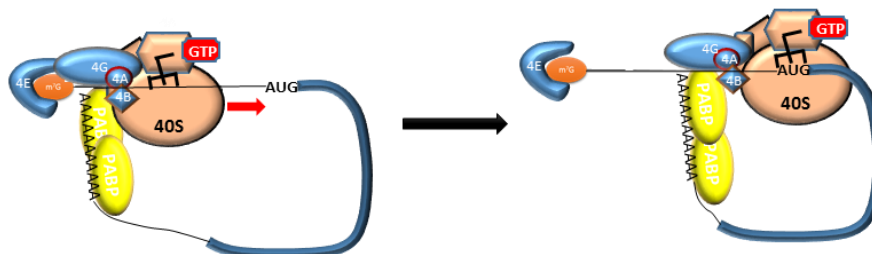


Figure 22 – Balayage de la région 5' non traduite. Le complexe 43S balaie la région 5'UTR de l'ARNm jusqu'à ce que l'anti-codon de l'ARNt initiateur reconnaisse le codon initiateur de la traduction. (Adapté de Jackson et al., 2010)

c Assemblage du ribosome 80S

Cet évènement induit une modification de la conformation du complexe. Ce bouleversement permet l'hydrolyse du GTP lié à eIF2. La grande sous-unité du ribosome 60S et eIF5B-GTP s'associent alors à la petite sous-unité du ribosome pour former le ribosome 80S. De manière concomitante à cet assemblage, des facteurs tels que eIF1, eIF2, eIF3, eIF4B et eIF5 sortent du complexe. A la suite de ces évènements, l'hydrolyse du GTP porté par eIF5B conduit à la formation d'un ribosome compétent pour l'élongation (Fig. 23).

2 Régulation de la traduction par des éléments IRES

Un « Internal Ribosome Entry Site » (IRES) est une séquence située généralement en 5'UTR d'un ARNm qui permet la traduction de l'ARNm de manière coiffe-indépendante. Ce sont des séquences très structurées, capables de recruter la machinerie traductionnelle. DDX6 remodèle le site IRES de l'ARNm du proto-oncogène c-myc (Matsui et al., 2006). Cette capacité de DDX6 à interagir avec l'IRES de c-myc pourrait être le mécanisme expliquant l'action stimulatrice de DDX6 envers la traduction de c-myc (Hashimoto et al., 2001). DDX6 posséderait différents effets sur la traduction associée à des IRES. En effet, une interaction de DDX6 avec la région 5'UTR contenant un IRES de l'ARNm du facteur angiogénique VEGF a été rapportée. Cette interaction serait à l'origine de la répression de l'expression de VEGF par DDX6 (de Vries et al., 2013).

3 Régulation de l'initiation de la traduction par des protéines interagissant avec la région 3'UTR

La plupart des mécanismes de régulation de l'initiation de la traduction sont contrôlés par l'interaction de complexes protéiques avec la région 3'UTR. La majorité de ces complexes répresseurs qui régulent la traduction se conforment à une mécanique commune qui a donné naissance au modèle suivant :

Une protéine X se lie à une séquence spécifique au sein de la région 3'UTR de l'ARNm cible. Elle forme un complexe avec une protéine Y intermédiaire qui interagit avec une protéine Z qui se lie à son tour à la coiffe de l'ARNm. Ainsi, une boucle fermée inhibitrice de la traduction se forme. L'identité des protéines X, Y, Z varie selon le complexe ou l'espèce considéré. Le nombre de protéines impliquées dans cette chaîne peut également varier (pour revue, Jackson et al., 2010).

4 Interaction de DDX6 avec des complexes répresseurs de la traduction

a La répression de la traduction par le complexe CPEB

La « Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein » (CPEB) est un facteur régulant la traduction d'ARNm spécifiques initialement identifié dans le modèle d'ovocyte de Xénope. Ce modèle est particulièrement intéressant pour l'étude de la répression de la traduction car de nombreux ARNm sont maintenus dormants jusqu'aux dernières étapes de maturation de l'ovocyte voire pour certains ARNm jusqu'à l'embryogénèse. Ce facteur se lie dans la région 3'UTR au « Cytoplasmic Polyadenylation Element » présents dans certains ARNm spécifiques. CPEB s'associe avec des facteurs aux fonctions antagonistes tels que Gld-2, une poly(A)-polymerase ou PARN, une poly(A)-ribonuclease. De cette manière, CPEB régule indirectement l'activation ou la répression de la traduction en allongeant ou raccourcissant la taille de la queue poly(A). Lorsque celle-ci est suffisamment longue, des protéines PABP peuvent se lier et activer la traduction. CPEB réprime également l'initiation de la traduction en recrutant des protéines interagissant avec eIF4E tels que Maskin chez l'ovocyte de Xénope, neuroguidin dans les neurones ou encore 4E-transporter (4E-T). Ces interactions préviennent l'association d'eIF4E avec eIF4G et, par voie de conséquence, la traduction (pour revue Darnell and Richter, 2012; Mendez and Richter, 2001) (Fig. 24A).

La traduction *in situ* au sein de l'élément post-synaptique figure parmi les mécanismes qui sous-tendraient la plasticité synaptique. Ainsi, le complexe CPEB régule la synthèse protéique au sein des dendrites et son activité serait modulée par l'activité synaptique (Atkins et al., 2004; Wu et al., 1998). De plus, des souris invalidées pour le gène CPEB-1 présentent une altération de la LTP, de la LTD ainsi qu'une réduction du phénomène d'extinction (Alarcon et al., 2004 ; Berger-Sweeney et al., 2006).

Ce complexe CPEB pourrait être impliqué dans la répression traductionnelle induit par DDX6. En effet, dans l'ovocyte de Xénope, des interactions entre DDX6, CPEB et d'autres facteurs répresseurs appartenant au complexe CPEB tels que Rap55 et Pat1 a été mis en évidence (Minshall et al., 2001, 2009) (Fig. 24A). De plus, cette interaction entre DDX6 et CPEB semble conservée dans d'autres espèces telle que *Drosophila Melanogaster* (Wong et al., 2011).

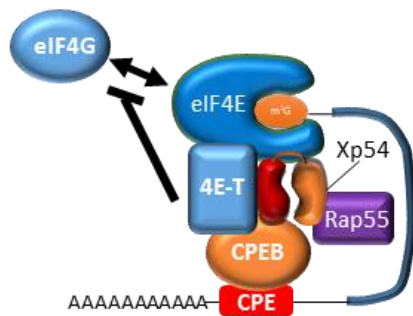
b D'autres complexes répresseurs de la traduction

DDX6 est également impliquée dans d'autres complexes répresseurs.

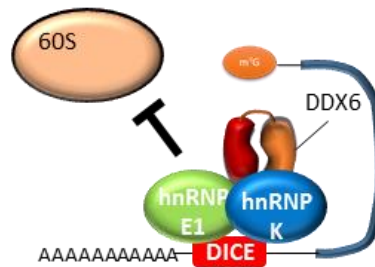
L'érythropoïèse est un phénomène particulièrement intéressant au regard de la répression traductionnelle. En effet, au cours de l'érythropoïèse se produit un phénomène d'extrusion du noyau. Un stock d'ARNm codant la 15-lipoxygénase est synthétisé avant l'énucléation et est maintenu réprimé au cours de la maturation des érythrocytes. Aux derniers stades de la différenciation, la répression est levée, la 15-lipoxygénase est synthétisée et participe à la rupture de la mitochondrie nécessaire à la maturation de l'érythrocyte. La traduction de cette protéine est contrôlée par la liaison du complexe hnRNPs K et E1 à la séquence régulatrice « Differentiation Control Element » (DICE) située dans la région 3'UTR. Cette interaction inhibe l'assemblage de la sous-unité 60S et empêche, en conséquence, la formation du ribosome 80S (Ostareck et al., 2001). DDX6 interagit avec ce complexe et est nécessaire à la répression traductionnelle de la 15-lipoxygénase (Naarmann et al., 2010) (Fig. 24B).

Chez la drosophile, Me31b, orthologue de DDX6 participe à la répression d'ARNm impliqués dans le développement (Chekulaeva et al., 2006). A titre d'exemple, la traduction de l'ARNm oskar est finement régulée. Cette répression est assurée par la protéine Bruno qui se lie au « Bruno Response Element » (BRE) dans la région 3'UTR. Bruno interagit avec la protéine Cup qui lie la protéine eIF4E. Se faisant, ce complexe inhiberait l'interaction entre eIF4E et eIF4G et empêcherait l'initiation de la traduction (Nakamura et al., 2001, 2004) (Fig. 24C). Me31b est localisée au niveau des dendrites et est impliquée dans la répression de CaMKII, une protéine essentielle de la plasticité synaptique (Hillebrand et al., 2010).

A) Complexe CPEB/4E-T



B) Complexe hnRNPs K et E1



C) Complexe Bruno/Cup

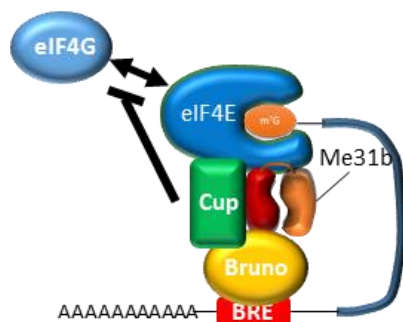


Figure 24 – Implication de DDX6 au sein de complexes répresseurs de la traduction. (A) Xp54, orthologue de DDX6, interagit au sein de l'ovocyte de Xénope avec le complexe CPEB/4E-T. Lorsque ce complexe interagit avec une séquence CPE localisée en 3'UTR de certains ARNm, inhibe sa traduction en empêchant la formation du complexe eIF4F. (C) Un mécanisme similaire existe chez la *Drosophila Melanogaster*. Me31b, orthologue de DDX6, interagit avec Cup/eIF4E et prévient la formation du complexe eIF4F. (B) DDX6 est également impliquée dans la répression traductionnelle assurée par le complexe hnRNP E1 / hnRNP K. Ce complexe inhibe la formation du ribosome 80S et, par voie de conséquence, réprime la traduction.

Alors que des complexes répresseurs sont spécifiques d'ARNm cibles et nécessitent la présence d'une séquence particulière au sein de la région 3'UTR, il semble que DDX6 soit un facteur commun à ces différents complexes. Une étude montre *in vitro* que DDX6 se lie de manière non-spécifique le long de l'ARNm en le relaxant (Ernault-Lange et al., 2012). Cette présence de DDX6 au sein de régions critiques telles que la coiffe 5' et la région 3' UTR confère à cette protéine la capacité de réprimer l'ARNm et de potentiellement réguler sa stabilité.

II. Rôle de DDX6 dans la stabilité des ARN

La régulation de la stabilité d'un ARNm constitue un autre levier dans le contrôle de la synthèse d'une protéine. Cette stabilité est la résultante d'interactions complexes entre les éléments qui structurent l'ARNm et des complexes protéiques. Ces mécanismes peuvent être généraux ou cibler des ARNm spécifiques. Ils peuvent réguler la demi-vie des ARNm ou exercer un contrôle qualité en éliminant les ARNm potentiellement toxiques. Dans cette section nous nous attarderons sur l'implication de DDX6 dans la voie générale de dégradation des ARNm ainsi que dans l'instabilité d'ARNm spécifiques.

1 La déadénylation : voie majeure de la dégradation des ARNm eucaryotes

La plupart des ARNm sont dégradés par des exonucléases s'attaquant aux extrémités de l'ARNm dans le sens 3'-5' ou 5'-3'. Or, la coiffe et la queue poly-A associés à des complexes protéiques protègent l'ARNm de l'action des nucléases. En conséquence, la dégradation de l'ARNm nécessite l'hydrolyse de ces structures terminales.

a La déadénylation

La longueur de la queue poly-A est un facteur décisif impliqué dans la traduction et la stabilité de l'ARNm. La déadénylation, le raccourcissement de la queue poly-A est l'élément déclencheur de la dégradation de l'ARNm. Ce phénomène est catalysé par différents complexes chez les eucaryotes : le complexe « Poly-A Nuclease » (PAN), le complexe majeur CCR4-NOT et la protéine « Poly-A RiboNuclease » (PARN) (Pour revue : Chen and Shyu, 2011; Wu and Brewer, 2012). Le complexe PAN est constitué des protéines PAN2 et PAN3 où PAN2 constitue la sous-unité catalytique. Activé par PABP, PAN3 permet notamment le recrutement de PAN2 au niveau de la queue poly-A. PAN est responsable de l'initiation de la déadénylation. Son action déstabilise la liaison de l'ARNm à PABP et lèverait l'inhibition de cette dernière sur l'activité de CCR4-NOT (Tucker et al., 2002). Ainsi, l'hydrolyse de la queue poly-A est complétée par le complexe CCR4-NOT (Wahle and Winkler, 2013) (Fig. 25). Enfin, PARN est une déadénylase dont l'activité est stimulée par la présence de la coiffe 5' (Dehlin et al., 2000).

b Le décoiffage

La déadénylation est suivie par le processus d'hydrolyse de la coiffe ou décoiffage (Muhlrاد et al., 1994; Yamashita et al., 2005). Le raccourcissement de la queue poly-A permet la liaison du complexe Lsm1-7/Pat1 à l'extrémité 3'. Cette interaction déclenche l'hydrolyse de la coiffe par le complexe DCP1/DCP2 où DCP2 est la sous-unité catalytique et DCP1 une sous-unité régulatrice (Tharun, 2009 ; Wang et al., 2002). Ainsi décoiffé, l'ARNm s'engage dans la voie de dégradation 5'-3' assurée par l'exoribonucléase XRN1.

Alternativement, l'ARNm déadénylé peut être dégradé dans le sens 3'-5' par l'exosome suivi de l'hydrolyse de la coiffe par la protéine « scavenger decapping enzyme » (DcpS) (Wang and Kiledjian, 2001) (Fig. 25).

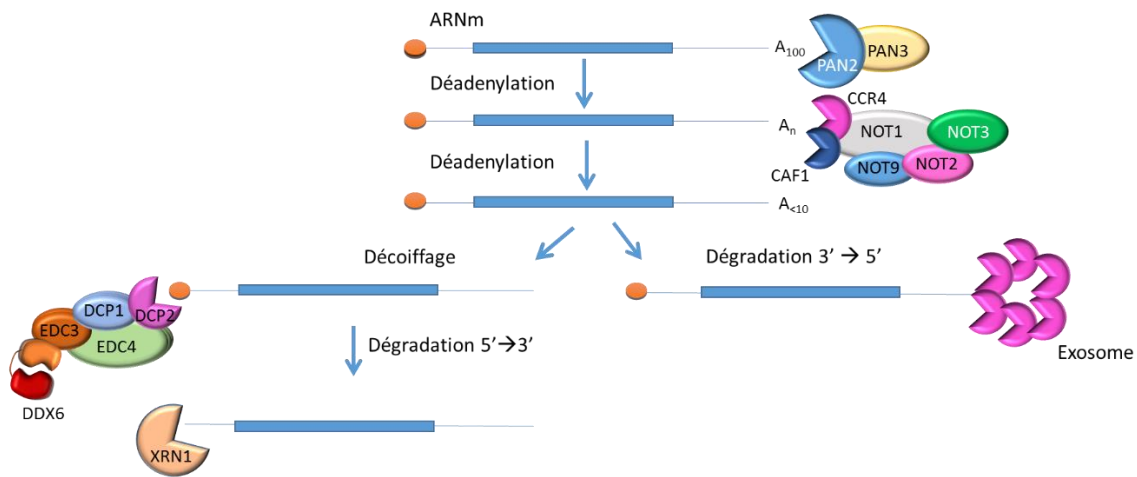


Figure 25 – La déadénylation : voie majeure de la dégradation des ARNm. Cette voie de dégradation est dépendante des complexes de déadénylation. Elle débute par le raccourcissement de la queue poly(A) par le complexe PAN2/PAN3. Le complexe CCR4-NOT prend ensuite le relais de la déadénylation. Deux mécanismes peuvent dégrader ensuite l'ARNm, soit la voie 5'-3' ou la voie 3'-5'. La voie 5'-3' correspond à la voie du décoiffage. Elle consiste en l'hydrolyse de la coiffe 5' de l'ARN par un complexe composé de DCP2, l'unité catalytique de ce complexe, et de facteurs activateurs tels que DDX6. Suite à l'hydrolyse de la coiffe, l'exonucléase XRN1 dégrade l'ARN dans le sens 5'-3'. Alternativement, la voie de dégradation 3'-5' implique l'exosome qui va dégrader l'ARN suite à la déadénylation dans la direction 3'-5'.

2 Implication de DDX6 dans la déadénylation

Des expériences de co-immunoprécipitations et de double-hybride ont montré une interaction de DDX6 avec Caf1, protéine qui forme avec CCR4, les deux sous-unités

catalytiques de CCR4-NOT1 (Coller et al., 2001; Hata et al., 1998). Ces données ont été récemment complétées par la mise en évidence, par co-immunoprécipitation, GST-pulldown et cristallographie, d'une interaction entre DDX6, en particulier son domaine C-terminal, et CNOT1, grande sous-unité « d'échaffaudage » du complexe CCR4-NOT1 (Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014; Rouya et al., 2014). Cette interaction de DDX6 avec différents éléments d'un même complexe de déadénylation suppose son implication dans ce processus ou un rôle de couplage avec le mécanisme de décoiffage dans lequel DDX6 se trouve être également impliquée (Fig. 25).

3 Implication de DDX6 dans le décoiffage

DDX6 est une protéine activatrice du décoiffage. En effet, son invalidation conduit à l'accumulation d'ARNm déadénylés coiffés (Coller et al., 2001; Fischer and Weis, 2002). En raison de son interaction directe avec des co-facteurs du décoiffage tels que Pat1, « enhancer of decapping-3 » (EDC3), Lsm14a et indirecte envers DCP1 et DCP2 (Jonas and Izaurralde, 2013), elle pourrait être impliquée dans le recrutement de ces facteurs au niveau d'ARNm déadénylés.

4 Rôle de DDX6 dans la régulation de la stabilité d'ARNm spécifiques par les « adenylate-uridylate-rich elements »

Outre son activité dans la voie de dégradation générale des ARNm, des interactions de DDX6 avec des systèmes régulateurs de la stabilité d'ARNm spécifiques ont pu être observées. Les « Adenylate-uridylate-rich elements » (ARE) sont des séquences localisées en 3'UTR. Elles forment des motifs reconnus par des protéines de liaison à l'ARN qui vont moduler sa stabilité. DDX6 module la stabilité des ARNm au travers de ce mécanisme (Kramer and Carrington, 2014; Qi et al., 2012). A titre d'exemple, DDX6 interagit avec Cth2, un facteur se liant aux séquences ARE de protéines impliquées dans le métabolisme du fer telles que la succinate deshydrogenase SDH4. En réponse à une déficience en fer, DDX6 promouvrait, par cette interaction, la dégradation de l'ARNm SDH4 (Pedro-Segura et al., 2008).

III. Rôle de DDX6 dans la voie des microARN

Les micro-ARN (miARN) sont des molécules d'ARN non-codantes simple-brin d'une vingtaine de nucléotides. Ils constituent des régulateurs post-transcriptionnels impliqués dans une large variété de processus cellulaires. Leur appariement à un ARNm cible complémentaire peut conduire à la répression, à l'activation traductionnelle ou encore à la dégradation de ce susdit ARNm. Chez les mammifères, des prédictions bio-informatiques estiment à plus de 60% les ARNm dont le sort serait modulé par ce mécanisme (Friedman et al., 2009).

1 Biogénèse des microARN

Le gène codant un miARN est transcrit sous la forme d'un miARN primaire. C'est une longue molécule d'ARN contenant une structure tige-boucle dans laquelle est incorporé le miARN mature. Ce miRNA primaire va subir des étapes de maturation afin de devenir fonctionnel. La maturation est initiée par l'action d'un complexe microprocesseur dans lequel figure la RNase Drosha. Celle-ci va cliver le miARN primaire au niveau du repliement en tige-boucle et libérer sa partie supérieure. Cette petite tige-boucle d'environ 70 nucléotides, appelée pre-miARN est ensuite exportée dans le cytoplasme par un complexe comprenant notamment l'Exportin 5. La boucle est ensuite hydrolysée par l'action de la protéine Dicer. Le petit ARN double-brin ainsi généré est pris en charge par une protéine AGO pour former le complexe «pre - RNA-induced silencing complex » (pre-RISC). Puis, les deux brins vont être dissociés. Le brin passager est écarté et dégradé. Seul le brin guide correspondant au miARN mature est conservé au sein du complexe RISC fonctionnel. Ce complexe peut alors moduler la traduction d'un ARNm cible (pour revue Ha and Kim, 2014) (Fig. 26).

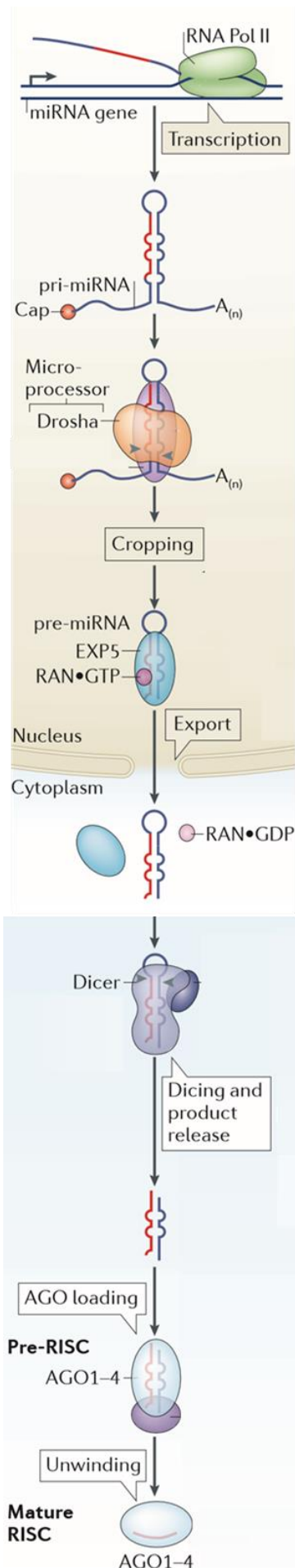


Figure 26 – Biogénèse des micro-ARN. Le miARN est transcrit par la RNA polymérase II. Le brin guide du miARN, brin fonctionnel pour le mécanisme d'ARN interférence, est figuré en rouge. Le pri-miARN est pris en charge par le complexe microprocesseur contenant notamment Drosha. Clivé, il constitue le pre-miARN. Ce dernier est pris en charge par le complexe exportin 5 / RAN-GTP et exporté dans le cytoplasme. Le pre-miARN est modifié par Dicer. Il en résulte le clivage de la boucle du pre-miARN. Le duplex est relâché puis chargé sur une protéine AGO. Le brin passager est écarté. Ce complexe forme alors un complexe RISC mature fonctionnel. (Modifié de Ha and Kim, 2014)

2 Mécanismes d'extinction de l'expression d'un gène par les microARN : rôle de DDX6

La régulation de la traduction d'un ARNm spécifique par un miARN repose sur la prise en charge de ce dernier par le complexe RISC et l'appariement imparfait de la région « seed » du miARN, localisée entre le nucléotide 2 et 7 de son extrémité 5', à une séquence cible généralement située dans la région 3'UTR de l'ARNm (Lewis et al., 2005). La conséquence de cette hybridation est une inhibition de la synthèse de la protéine associée. De nombreuses études montrent une implication de DDX6 dans cette régulation de l'expression génique par les miARN. DDX6 interagit avec des composants du complexe RISC tels que AGO1, AGO2 (Chu and Rana, 2006). De plus, la déplétion de DDX6 lève la répression de l'expression génique assurée par le miARN let-7 (Beilharz et al., 2009; Chu and Rana, 2006; Nicklas et al., 2015; Rouya et al., 2014).

Cette répression de l'expression génique est une conséquence d'une inhibition de la traduction ou d'une activation de la dégradation de l'ARNm. Par la technique de profilage de ribosome, l'équipe du Dr D.P. Bartel a montré que l'extinction globale de l'expression génique par les miARN résulte davantage de la déstabilisation de l'ARNm plutôt que de l'inhibition de sa traduction (Eichhorn et al., 2014; Guo et al., 2010).

a Dégradation d'ARNm cible de miARN

La déstabilisation d'un ARNm par un miARN est initiée par sa déadénylation, suivie par l'hydrolyse de sa coiffe et sa dégradation par la voie 5'-3' (Jonas and Izaurralde, 2015). Au sein du complexe RISC, AGO interagit avec la protéine GW182. Cette protéine est nécessaire à l'extinction de l'expression génique assurée par les miARN (Rehwinkel et al., 2005). Elle est constituée d'un domaine de liaison à AGO ainsi que d'un « silencing domain » (SD) qui interagit avec PABPC. Cette interaction permettrait au complexe RISC de s'accrocher à la queue poly-A et pourrait inhiber l'action promotrice de PABPC vis-à-vis de la traduction. A l'image d'une plate-forme, ce domaine SD permet le recrutement de la machinerie de dégradation, à savoir les deux complexes impliqués dans la déadénylation des ARNm : PAN2-PAN3 et CCR4-NOT (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011; Fabian et al., 2011). DDX6 se lie à la protéine CNOT1 du complexe CCR4-NOT et formerait le lien nécessaire au couplage de la déadénylation avec le recrutement d'acteurs du décoiffage (Chen et al., 2014; Mathys et

al., 2014). Cependant, 4E-T, Pat1, Lsm14a et EDC3 interagissent avec la même région de DDX6. Ceci implique que ces interactions sont mutuellement exclusives (Sharif et al., 2013; Tritschler et al., 2009). Une étude a récemment mis en évidence que, parmi ces facteurs, seul 4E-T peut s'associer à DDX6 lorsque DDX6 interagit avec CNOT1 (Ozgun et al., 2015). Cette étude suggère une progression séquentielle de l'interaction de DDX6 avec ses différents complexes partenaires. Ainsi, DDX6 pourrait former un complexe répresseur de la traduction avec 4E-T et CNOT1 puis activer le décoiffage et la dégradation (Fig. 27).

Quoi qu'il en soit, DDX6 est cruciale dans la voie des miARN. En effet, la déplétion en DDX6 inhibe l'extinction génique induit par les miARN. De plus, les cellules complémentées avec des mutants de DDX6, dont l'interaction avec CNOT1 est abolie, ne présentent pas une activité des miARN restaurée (Rouya et al., 2014). Chez *Drosophila Melanogaster*, la déplétion de l'orthologue de DDX6 conduit à l'accumulation de cibles de miARN non-dégradées, déadénylées et coiffées (Eulalio et al., 2009). L'ensemble de ces études soulignent l'importance de DDX6 dans le processus de recrutement des acteurs du décoiffage et, par voie de conséquence, dans la dégradation des ARNm ciblés par les miARN.

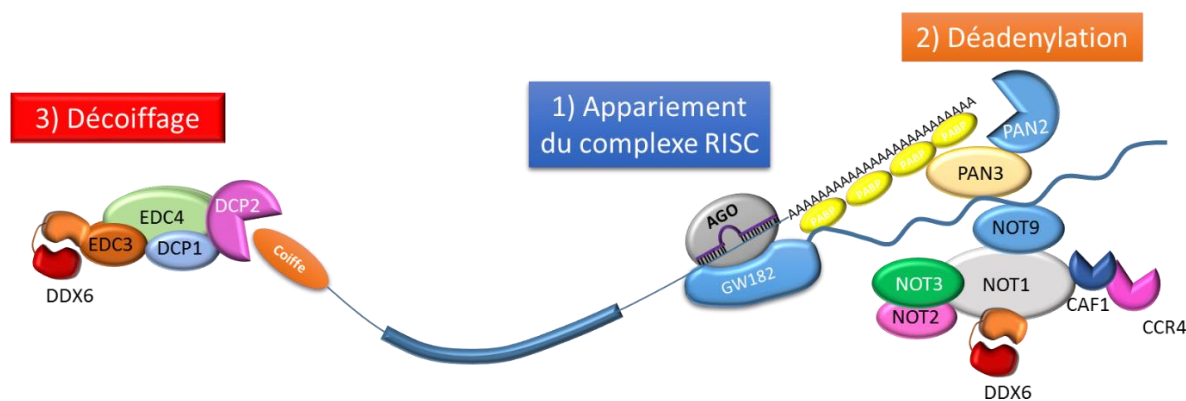


Figure 27 – Modèle d'une implication de DDX6 dans la dégradation d'ARN cibles de miARN. (1) Le miARN associé au complexe RISC s'apparie à son élément de réponse situé en 3'UTR. (2) Cet appariement permet le recrutement de la protéine GW182 qui recrute à son tour la machinerie nécessaire à la déadénylation de l'ARN cible parmi lesquels les complexes PAN2-PAN3 et Caf1-CCR4. (3) La déadénylation induit l'entrée dans la voie de dégradation 5'-3' et le recrutement du complexe de décoiffage. DDX6 interagit avec les complexes de déadénylation et de décoiffage. Il apparaît que ces interactions sont mutuellement exclusives. Au sein du complexe de déadénylation, DDX6 pourrait inhiber la traduction puis, de manière séquentielle, activer le décoiffage.

b Répression de la traduction d'ARNm cible de miARN

Le premier miARN découvert, *lin-4*, fut décrit comme capable de réprimer la traduction de l'ARNm *lin-14* sans influencer sur son abondance (Lee et al., 1993). Ce travail soulève de nombreuses interrogations concernant les mécanismes sous-jacents à cette répression. Différents modèles ont été proposés tels qu'une inhibition de l'initiation de la traduction ou encore une entrave des étapes post-initiation (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Toutefois, un consensus émerge appuyé par de nombreuses études en faveur d'une inhibition de l'initiation de la traduction (Guo et al., 2010; Humphreys et al., 2005; Mathonnet et al., 2007; Pillai et al., 2005). En effet, la répression traductionnelle induite par les miARN nécessite la présence d'ARN coiffé (Mathonnet et al., 2007; Pillai et al., 2005).

Des rapporteurs luciférase cibles de miARN et disposant de séquences IRES issues de différents virus ont été utilisés afin de préciser quelle étape de la traduction est nécessaire à la répression par les miARN. La séquence IRES du virus de la paralysie du criquet (CrPV) ne nécessite aucun facteur d'initiation. Elle est reconnue par les sous-unités ribosomales et promeut l'élongation. La séquence IRES du virus de l'hépatite C (HCV), quant à elle, se lie à la sous-unité 40S du ribosome et nécessite l'action des facteurs eIF2, eIF3 et eIF5. Enfin, la séquence IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) est la seule à nécessiter le complexe d'initiation eIF4F afin d'initier la traduction. Il s'avère que les rapporteurs contenant les séquences IRES CrPV et HCV sont résistants à l'action des miRNA. En revanche, le rapporteur IRES EMCV est partiellement réprimé par l'action des miRNA. Ces résultats suggèrent que les miARN inhibent la traduction en s'ingérant dans l'initiation de la traduction assurée par le complexe eIF4F (Meijer et al., 2013). Un des modèles actuels proposé pour expliquer cette inhibition de la traduction repose sur l'action du complexe miARN-RISC sur eIF4A qui empêcherait le balayage du ribosome 43S (Fukao et al., 2014; Fukaya et al., 2014; Ricci et al., 2013).

Alternativement, la répression de la traduction peut être indépendante du balayage de l'ARNm par le ribosome 43S. Elle implique GW182 et le complexe CCR4-NOT et nécessite DDX6 (Kuzuoğlu-Öztürk et al., 2016). Les mécanismes de répression de la traduction modulés par les miARN demeurent obscurs. Néanmoins, une interaction de CNOT1 et DDX6 avec la protéine 4E-Transporter (4E-T) a été mise en évidence (Ozgur et al., 2015). 4E-T est en compétition avec eIF4G pour la liaison d'eIF4E et intervient dans la répression de la traduction (Kamenska et al., 2014). Récemment, il a été mis en évidence que l'interaction entre DDX6 et

4E-T est impliquée dans la voie de répression traductionnelle par les miARN (Kamenska et al., 2016). Les processus de déadénylation et de répression de la traduction pourraient être mécaniquement associés grâce à cette voie CNOT1-DDX6-4E-T (Fig. 28).

Cette inhibition de la traduction est réversible et l'ARNm peut éventuellement s'engager dans la traduction (Muddashetty et al., 2011).

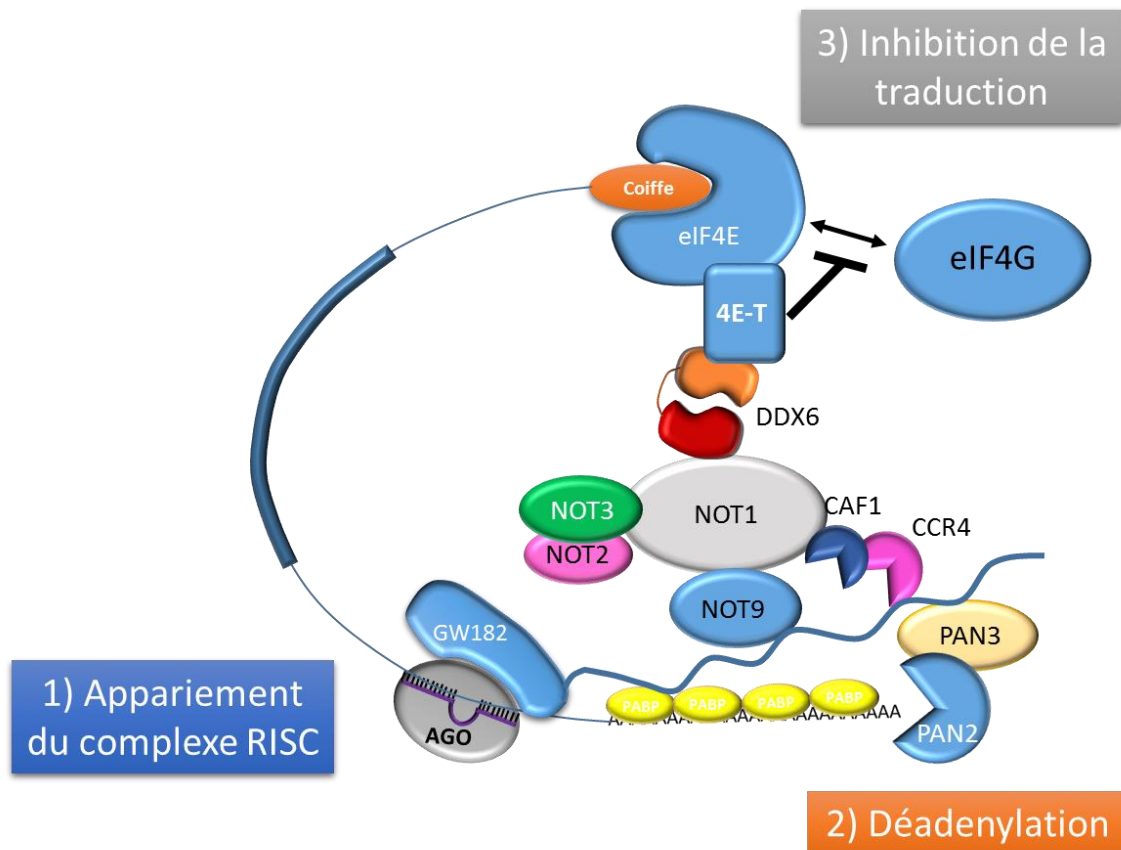


Figure 28 – Modèle d’une implication de DDX6 dans la répression de la traduction d’ARN cibles de miARN. (1) Le miARN associé au complexe RISC s’apparie à son élément de réponse situé en 3’UTR. (2) Cet appariement permet le recrutement de la protéine GW182 qui recrute à son tour la machinerie nécessaire à la déadénylation de l’ARN cible parmi lesquels les complexes PAN2-PAN3 et Caf1-CCR4. (3) DDX6 interagit avec le complexe CCR4-CNOT1 et 4E-T. Cette protéine réprime la traduction en inhibant la formation du complexe eIF4F.

IV. Rôle de DDX6 dans les processing bodies et les granules de stress.

Les cellules sont constellées de foci denses formés de complexes ribonucléoprotéiques. Ils semblent constituer des « hot spot » dynamiques impliqués dans la vie des ARN. Ces granules se distinguent par leurs compositions, leurs formations ou leurs fonctions putatives.

Ici, nous nous intéresserons aux processing bodies (P-bodies) ainsi qu'aux granules de stress, deux structures, parmi les mieux caractérisées, dans lesquelles DDX6 co-localise et potentiellement impliquées dans les processus cellulaires évoqués précédemment.

1 Les processing bodies

a Composition des processing bodies

Les processing bodies (P-bodies) sont des granules cytoplasmiques dépourvus de membrane, d'environ 300-400nm de diamètre et contenant des complexes ribonucléoprotéiques réprimés traductionnellement (Souquere et al., 2009). Ils sont caractérisés par la localisation en leurs sein de protéines impliquées dans le décoiffage : DCP1, DCP2, EDC3, EDC4 et DDX6 (van Dijk et al., 2002; Eulalio et al., 2007a; Ingelfinger et al., 2002), la voie de dégradation 5'-3' : XRN1 (Bashkirov et al., 1997; Ingelfinger et al., 2002), la déadénylation : CCR4-CNOT1, PAN2-PAN3 (Cougot et al., 2004; Zheng et al., 2008), la voie des miARN : AGO1, AGO2, GW182, ou encore d'autres mécanismes de répression traductionnelle tels que CPEB, TTP (Fenger-Grøn et al., 2005; Wilczynska et al., 2005).

b Formation des processing bodies

La formation de P-bodies nécessite la présence d'ARNm non-traduits. Lorsque des P-bodies partiellement purifiés sont traités à la RNase A, leur nombre diminue drastiquement. En condition de sur-expression d'ARNm non traduits, les P-bodies augmentent en taille et en nombre (Teixeira et al., 2005). Le traitement des cellules à la cycloheximide, provoquant le blocage du processus d'élongation de la traduction et le maintien des ribosomes associés à l'ARNm, induit une diminution de la quantité de P-bodies (Cougot et al., 2004; Teixeira et al., 2005). A l'inverse, lors de l'application d'un stress inhibant l'initiation de la traduction et dissociant les ARNm des ribosomes, les P-bodies augmentent de taille (Teixeira et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les P-bodies se forment autour d'ARNm dont l'initiation de la traduction est réprimée. Outre l'ARNm, certaines protéines sont nécessaires au maintien des P-bodies. Ainsi, la déplétion, par ARN interférence, de certaines protéines composant les P-bodies telles que GW182, DDX6, LSM14A, CPEB induit une diminution de la quantité de P-bodies (Chu and Rana, 2006; Yang, 2004; Yang et al., 2006). DDX6 apparaît comme une protéine

majeure pour la formation des P-bodies. En effet, contrairement à certains acteurs impliqués uniquement dans le maintien des P-bodies, DDX6 est également indispensable à la formation *de novo* de P-bodies (Ayache et al., 2015; Minshall et al., 2009).

c Fonctions des processing bodies

Au regard des protéines localisées au sein des P-bodies, il semble que les P-bodies soient impliqués dans la dégradation des ARNm, leur répression ou leur stockage en vue d'un retour vers la machinerie traductionnelle. Cette place particulière qu'occupent les P-bodies dans le métabolisme des ARNm conduit I. Bruno et M.F. Wilkinson à qualifier les P-bodies de « purgatoire des ARNm » (Bruno and Wilkinson, 2006).

En bloquant l'ARNm en phase d'élongation de la traduction, la cycloheximide stabilise l'ARNm. Piégé dans le polysome, il est protégé de la dégradation. Or, cette inhibition de la dégradation conduit à la disparition des P-bodies (Cougot et al., 2004; Teixeira et al., 2005). Réciproquement, le blocage de l'ARNm dans la voie de dégradation 5'-3' a été réalisée par ARN interférence, utilisation d'un mutant non-fonctionnel pour XRN1 ou par la sur-expression d'un ARNm disposant d'une forte structure secondaire localisée en 3'UTR, agissant comme un obstacle à l'action de XRN1. Ce blocage de l'ARNm au cours de sa dégradation induit une augmentation du nombre et de la taille des P-bodies ainsi qu'à une co-localisation de ces intermédiaires de dégradation avec les P-bodies (Cougot et al., 2004; Sheth and Parker, 2003; Teixeira et al., 2005). Ces différentes études suggèrent que les P-bodies sont impliqués dans la dégradation des ARNm.

Intuitivement, les localisations de GW182, AGO1, AGO2 au sein des P-bodies suggèrent un rôle de ces structures dans la voie des miARN. Cependant, l'activité des miARN n'est pas affectée par l'absence des P-bodies. La déplétion de Lsm1, composant des P-bodies, induit la disparition des P-bodies mais ne modifie pas la répression traductionnelle assurée par le miARN Let-7a (Chu and Rana, 2006). Bien que le phénomène d'ARN interférence ne nécessite pas la présence de P-bodies, l'inhibition des voies de régulation par les siARN et les miARN conduit à une diminution du nombre et de la taille des P-bodies. Cette observation suggère que les P-bodies, à défaut d'être une cause, sont une conséquence de la voie des miARN (Eulalio et al., 2007b).

Les P-bodies sont également impliqués dans le stockage d'ARNm dont la traduction est réprimée, notamment par les miARN. Ainsi, dans des cellules d'hépatome, l'ARNm de « cationic amino acid transporter 1 » (CAT-1) est maintenu réprimé au sein des P-bodies sous l'effet du miR-122. Cette répression est réversible et sa levée conduit ces ARNm à quitter les P-bodies et s'orienter vers les polysomes (Bhattacharyya et al., 2006). Les P-bodies sont donc des granules impliqués dans le stockage réversible d'ARNm réprimés, de manière spécifique ou en réponse à un stress comme une carence en glucose (Brenques et al., 2005).

Le rôle des P-bodies dans ces mécanismes de dégradation d'ARNm et de répression de la traduction reste obscur. Néanmoins, les P-bodies sont des structures dynamiques qui interagissent avec d'autres granules ribonucléoprotéiques impliqués dans le métabolisme des ARNm tels que les granules de stress (Kedersha et al., 2005; Wilczynska et al., 2005). L'étude du paysage de ces complexes ribonucléoprotéiques et de leurs interactions permet de mieux appréhender le cycle de vie des ARNm.

2 Les granules de stress

Les ARNm non-traduits peuvent également se concentrer au sein des granules de stress (SG). Ces structures cytoplasmiques sont plus grandes que les P-bodies (1 à 2 µm de diamètre) et apparaissent en réponse à un stress qui inhibe la traduction des ARNm tel que le stress oxydant ou le stress hyperthermique. Ils partagent avec les P-bodies certains composants. Ainsi DDX6 est présent dans les P-bodies et les granules de stress. Cependant, les SG se distinguent par la présence de la petite sous-unité du ribosome 40S ainsi que des facteurs nécessaires à l'initiation de la traduction, suggérant une fonction différente (pour revue, Eulalio et al., 2007a). La fonction supposée de ces structures est de séquestrer, stocker et protéger les ARNm au cours du stress. Récemment une étude a mis en évidence que, dans les neurones, Tau est localisée au sein de ces granules et est impliquée dans leur formation (Vanderweyde et al., 2016).

DDX6 joue un rôle central dans la dégradation d'ARNm et la répression de la traduction. En effet, elle se trouve à la croisée des voies moléculaires impliquées dans la dégradation de l'ARNm et sa répression. Ces phénomènes s'opèrent lors du renouvellement général des ARNm ou peuvent cibler des ARNm spécifiques via notamment l'action des miARN. De manière remarquable, DDX6 est enrichie au sein de granules ribonucléoprotéiques. Ces

derniers se distinguent, en partie, par une composition en protéines associées à des clusters fonctionnels différents, qui présagent de leurs fonctions putatives respectives.

Objectifs

Ce travail de thèse s'est concentré sur l'étude des liens entre la protéine Tau et les acides nucléiques. Elle s'est articulée autour de deux objectifs :

Objectif 1 :

Tau protège l'ADN et l'ARN neuronal en condition physiologique et de stress hyperthermique, inducteur de stress oxydant. Or, l'analyse des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer montre une accumulation de dommages oxydatifs aux acides nucléiques notamment aux stades précoces de la pathologie (Bradley-Whitman et al., 2014; Nunomura et al., 2012). Notre hypothèse est que la capacité de Tau à protéger les acides nucléiques est altérée au cours de la maladie d'Alzheimer.

Notre premier objectif est donc de **tester l'impact de la pathologie Tau sur sa fonction protectrice vis-à-vis des acides nucléiques.**

Objectif 2 :

Des études ont mis en évidence des altérations du métabolisme des ARN au cours de la maladie d'Alzheimer telles qu'une altération de la traduction ou une dérégulation de l'expression des microARN (Ding et al., 2005; Lau et al., 2013; Meier et al., 2016). Tau est capable de se lier aux ARN *in vitro* (Kampers et al., 1996; Wang et al., 2006b). L'analyse de l'interactome de Tau montre qu'elle interagit en condition physiologique avec de nombreuses protéines impliquées dans la traduction ou le processing des ARN. Pourtant, peu de choses sont connues concernant le rôle de Tau dans le métabolisme des ARN. Dans le but d'investiguer cette potentielle fonction atypique de Tau, nous avons identifié des partenaires de Tau dans notre modèle cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y. Parmi ces partenaires, nous nous sommes intéressés à DDX6, un répresseur traductionnel impliqué dans la dégradation des ARN.

Notre second objectif est de **confirmer l'interaction Tau-DDX6 et déterminer le rôle de ce complexe dans le métabolisme des ARN.**

Résultats

***Etude 1 : Impact de la pathologie Tau sur la fonction
protectrice de Tau vis-à-vis des acides nucléiques in
vivo***

Etude 1 : Impact de la pathologie Tau sur la fonction protectrice de Tau vis-à-vis des acides nucléiques in vivo

A. Introduction

Une accumulation intra-neuronale de protéines Tau hyperphosphorylées est une lésion caractéristique des tauopathies, parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer est l'exemple le plus connu. Au cours du processus pathologique, la protéine Tau va progressivement s'hyperphosphoryler et adopter une conformation anormale conduisant à son oligomérisation. A terme, ces oligomères solubles forment de larges agrégats insolubles appelés dégénérescences neurofibrillaires. On parle de pathologie Tau. Pendant longtemps, ces dégénérescences neurofibrillaires furent considérées comme la cause de la neurotoxicité. Cependant, de plus en plus d'études mettent en évidence la toxicité des oligomères solubles et le caractère inerte des dégénérescences neurofibrillaires (Flach et al., 2012, Lasagna-Reeves et al., 2010, 2011, Tian et al., 2013).

Compte-tenu de l'activité métabolique intense du cerveau, celui-ci est continuellement exposé au stress oxydant. Or, il a été mis en évidence que Tau protège l'intégrité de l'ADN des effets du stress hyperthermique, inducteur de stress oxydant (Bruskov et al., 2002), dans des cultures primaires de neurones corticaux de souris (Sultan et al., 2011). Cette implication de Tau dans la protection de l'ADN neuronal a ensuite été testée *in vivo* dans des cerveaux de souris. Il s'avère que Tau maintient non seulement l'intégrité de l'ADN mais également celle de l'ARN en condition physiologique et de stress oxydant dans les neurones hippocampiques (Violet et al., 2014).

Une augmentation des dommages oxydatifs aux acides nucléiques, ADN et ARN, est caractéristique des stades précoces de la maladie d'Alzheimer (Bradley-Whitman et al., 2014; Nunomura et al., 2012). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'apparition de ces dommages aux stades précoces de la pathologie sont méconnus. Notre hypothèse est que la pathologie Tau altère la fonction protectrice de Tau vis-à-vis des acides nucléiques.

Notre objectif est de tester l'effet de la pathologie Tau sur l'intégrité des acides nucléiques dans un contexte de stress oxydant. Pour cela, nous avons utilisé des souris THY-Tau22, un modèle de souris transgénique, développant une hyperphosphorylation et une

agrégation progressive de la protéine Tau (Schindowski et al., 2006). Ces souris ont été soumises à un stress hyperthermique à différents stades de la pathologie Tau. Afin de tester l'effet de la pathologie Tau sur l'intégrité des acides nucléiques, les dommages aux acides nucléiques sont analysés au cours de la progression de la pathologie Tau.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication dans le journal « *Neurobiology of Disease* » et sont présentés sous forme d'un article :

B. Résultats

Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons *in vivo*.

Marie Violet^{a,1}, Alban Chauderlier^{a,1}, Lucie Delattre^{a,1}, Meryem Tardivel^a, Meliza Sendid Chouala^a, Audrey Sultan^a, Elodie Marciniak^a, Sandrine Humez^a, Lester Binder^b, Rakez Kaye^c, Bruno Lefebvre^a, Eliette Bonnefoy^d, Luc Buée^a, and Marie-Christine Galas^{a,*}

¹M.V., A.C. and L.D. contributed equally to this work.

¹Inserm, UMR1172, JPArc, Alzheimer & Tauopathies, 1 rue Polonovski, 59045 Lille, France; Université de Lille, Faculté de Médecine, (Place de Verdun, 59045) Lille, France ; CHRU, Memory Clinic Lille, France, ²Department of Translational Science & Molecular Medicine, College of Human Medicine, Michigan State University, 333 Bostwick Ave NE, Van Andel Institute, Grand Rapids, Michigan 49503, USA, ³Departments of Neurology and Neuroscience & Cell Biology, George and Cynthia Mitchell Center for Neurodegenerative Diseases, University of Texas Medical Branch, 301 University Blvd, Medical Research Building, Room 10.138C, Galveston, Texas 77555-1045, USA, ⁴Inserm UMRS 1007, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris Cedex 06, France.

*Corresponding author at: UMR1172, JPArc, Alzheimer & Tauopathies, 1 rue Polonovski, 59045 Lille, France. E-mail : marie-christine.galas@inserm.fr

Abstract

The accumulation of DNA and RNA oxidative damage is observed in cortical and hippocampal neurons from Alzheimer's disease (AD) brains at early stages of pathology. We recently reported that Tau is a key nuclear player in the protection of neuronal nucleic acid integrity *in vivo* under physiological conditions and hyperthermia, a strong inducer of oxidative stress. In a mouse model of tauopathy (THY-Tau22), we demonstrate that hyperthermia selectively induces nucleic acid oxidative damage and nucleic acid strand breaks in the nucleus and cytoplasm of hippocampal neurons that display early Tau phosphorylation but no Tau fibrils. Nucleic acid-damaged neurons were exclusively immunoreactive for prefibrillar Tau oligomers. A similar association between prefibrillar Tau oligomers and nucleic acid oxidative damage was observed in AD brains. Pretreatment with Methylene Blue (MB), a Tau aggregation inhibitor and a redox cyler, reduced hyperthermia-induced Tau oligomerization as well as nucleic acid damage.

This study clearly highlights the existence of an early and critical time frame for hyperthermia-induced Tau oligomerization, which most likely occurs through increased oxidative stress, and nucleic acid vulnerability during the progression of Tau pathology. These results suggest that at early stages of AD, Tau oligomerization triggers the loss of the nucleic acid protective function of monomeric Tau. This study highlights the existence of a short therapeutic window in which to prevent the formation of pathological forms of Tau and their harmful consequences on nucleic acid integrity during the progression of Tau pathology.

Key words:

Tau, Tau oligomers, Alzheimer, hyperthermia, oxidative stress, DNA damage, RNA damage, Methylene Blue

Introduction

Tau pathology, a hallmark of Alzheimer's disease (AD) and others tauopathies, is characterized by a time-dependent increase in Tau phosphorylation at specific sites and abnormal protein conformations, leading to aggregation into fibrils and, ultimately, neurofibrillary tangles (NFT). The prefibrillar oligomers observed at early stages of AD pathology, rather than larger aggregates, have emerged as the deleterious forms of Tau

(Patterson et al, 2011; Lasagna-Reeves et al, 2011; Flach et al, 2012; Mufson et al. 2013). However, the mechanisms governing the nucleation of Tau oligomers in AD pathology remain unknown.

In addition to its well-described role in microtubule assembly and stabilization, Tau is an essential nuclear player in the protection of neuronal genomic DNA integrity under hyperthermic stress (HS), which is known to generate abundant reactive oxygen species (ROS), primarily in neuronal cultures (Sultan et al, 2011). Recently, we demonstrated that Tau protects both genomic DNA and nuclear and cytoplasmic RNA integrity in hippocampal neurons *in vivo* under physiological and hyperthermic conditions (Violet et al, 2014).

An increase in oxidative DNA and RNA damage occurs in a subset of cortical and hippocampal neurons at the onset of Alzheimer's disease (AD) (Nunomura et al, 2012; Bradley-Whitman et al, 2014). Non-repaired nucleic acid damage is highly deleterious in neurons, as it can trigger transcriptional/translational dysregulation and chromosomal instability, as observed in AD (Zekanowski et al., 2009; Cooper-Knock, 2012). However, the mechanisms underlying the alteration of nucleic acid integrity in neurons during the early stages of AD pathogenesis are poorly understood. In particular, the potential role of Tau pathology in nucleic acid integrity has remained unexplored.

The major aim of this study was to analyze the effects of increasing stages of Tau pathology on nucleic acid integrity under ROS-producing conditions. A transgenic Tau pathology mouse model (THY-Tau22) (Shindowski et al., 2006) was subjected to HS (Violet et al., 2014) at mild, moderate and severe stages, and the nucleic acid integrity of hippocampal neurons was analyzed. This study clearly highlights the existence of an early and limited time window for DNA (nuclear) and RNA (cytoplasmic and nuclear) vulnerability to HS during the progression of Tau pathology. Importantly, these results revealed that HS was a driving force for the induction of Tau oligomerization, and this effect was observed selectively in the nuclei and cytoplasm of hippocampal neurons displaying early Tau phosphorylation but devoid of Tau fibrils. HS-induced nucleic acid oxidative damage and nucleic acid strand breaks were strictly associated with prefibrillar Tau oligomer accumulation. When administered prior to HS, an intra-peritoneal (ip) injection of methylthioninium chloride Methylene Blue (MB), which is known to inhibit Tau aggregation, prevented both Tau oligomerization and nucleic acid oxidative damage and strand breaks.

Material and methods

Animals

THY-Tau22 and littermate wild-type (WT) female mice were analyzed (Schindowski et al. 2006). In THY-Tau22 mice, Tau pathology begins at three months of age in the subiculum/CA1 subfield, the first brain regions affected in AD, spreading from there to the hippocampal dentate gyrus and cortex in older animals (Van der Jeugd et al., 2013). All of the animals were kept in standard animal cages under conventional laboratory conditions (12 h/12 h light/dark cycle, 22°C), with *ad libitum* access to food and water. The animals were maintained in compliance with institutional protocols (Comité d'éthique en expérimentation animale du Nord Pas-de-Calais, n° 0508003). All of the animal experiments were performed in compliance with and following the approval of, the local Animal Resources Committee (CEEA 342012 on December 12, 2012), standards for the care and use of laboratory animals, and the French and European Community rules.

Human brains

Human brain samples were obtained from the Lille Neurobank, which was given to the French Research Ministry by the Lille Regional Hospital (CHRU-Lille) on August 14, 2008 under the reference DC-2000-642. The Lille Neurobank fulfills criteria from the French Law on biological resources, including informed consent, ethics review committee and data protection (article L1243-4 du Code de la Santé publique, August 2007).

In vivo hyperthermia model

Age-matched 3-, 5- or 7-month-old mice were subjected to transient hyperthermic stress as previously described (Violet et al., 2014). Briefly, the mice were anesthetized using xylazine (20 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) and maintained in a 37°C environment for 30 min (control (C) group) or heat stressed (HS group) by being placed in an incubator containing ambient air heated to 44°C for 20 min. The rectal temperature of the mice was monitored every 10 min and did not exceed 41°C.

MB treatment

Five-month-old THY-Tau22 mice received an i.p. injection 20 min prior to anesthesia (xylazine (20 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg)). The i.p. injection consisted of either MB (4 mg/kg) or phosphate-buffered saline (PBS) (vehicle) (adapted from Deiana *et al.*, 2009). MB was dissolved in PBS and prepared extemporaneously. Following anesthesia, the mice were maintained in a 37°C environment for 10 min. The mice were then maintained at 37°C (control (C) group) or heat-stressed (HS group) by being placed in an incubator containing ambient air heated to 44°C for 20 min. The rectal temperature of the mice was monitored every 10 min and did not exceed 41°C.

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed as described previously (Violet *et al.*, 2014). Briefly, sagittal (5 μ M) brain slices were deparaffinized and unmasked using citrate buffer (3.75 mM acid citrate, 2.5 mM disodium phosphate, pH 6) for 10 min in a domestic microwave. The slices were submerged for 1 h in 1% horse serum (Vector Laboratories), and the primary antibodies were incubated overnight at 4°C in the presence of PBS-0.2% Triton. The following antibodies were used: 8-OHdG (Santa Cruz Biotechnology), which recognizes 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in DNA, 8-hydroxyguanosine (8-OHG) in RNA and 8-hydroxyguanine, AT8 (Thermo Scientific), Tau pT212 (Life Technologies), MC1 (generously provided by Dr. Peter Davies), AT100 (Thermo Scientific), TOC1 (generously provided by Dr. Lester Binder), T22 (generously provided by Dr. Rakez Kaye) and Tau-410 (Sigma-Aldrich). AT8 and PT212 are phospho-dependent antibodies that recognize the phosphorylated Ser202/pThr205 and phosphorylated Thr212 epitopes of Tau, respectively, which are present from the early to late stages of Tau pathology. MC1 recognizes an abnormal conformation of Tau observed in early AD (Weaver *et al.* 2008) that depends on amino acid segments 7–9 and 313–322. AT100 recognizes Tau phosphorylated at epitope Ser212/Thr214 and aggregated in sarkosyl-insoluble paired helical filaments (PHF) (Zheng-Fischhofer *et al.* 1998). Tau 410 recognizes a C-terminal Tau sequence. TOC1 (Patterson *et al.* 2011; Ward *et al.* 2013) and T22 (Lasagna-Reeves *et al.* 2012) specifically target prefibrillar Tau oligomers. These antibodies were revealed via secondary antibodies coupled to Alexa 488 or 568 (Life Technologies). The

sections were counterstained and mounted with Vectashield/DAPI (Vector Laboratories). 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used as a chromatin counterstain.

Immunofluorescence quantification

Nuclear immunofluorescence quantification was performed as previously described (Violet et al., 2014).

Mouse hippocampal sections were acquired using an LSM 710 confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss) equipped with a 488-nm Argon laser, 561-nm diode-pumped solid-state laser and a 405-nm ultraviolet laser. The images were acquired using an oil 40x Plan-NEOFLUAR objective (1.3 NA) and an oil 63X Plan-APOCHROMAT objective (1.4 NA). All recordings were performed using the appropriate sampling frequency (8 bits, 1024-1024 images and a line average of 4). Images is an array of pixel and each pixel contains information about the different light intensity or color. This information is encoded in grid as a gray level. The gray values or gray scale describe the fluorescence intensity of every pixel. Acquisitions in confocal microscope are executed in 8 bits, therefore the different alues of gray level of a pixel that can take are from 0 to 255 levels (0 no signal and 255 maximum signal).

The elliptical selection tool of ImageJ marked 20–30 representative nuclei based on DAPI staining. All immunofluorescence quantifications from the nuclear mean intensity fluorescence are expressed in gray values, and image analyses of the raw data were obtained using ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov.gate2.inist.fr/ij/>, NIH, USA) and ZEN (Carl Zeiss) software programs. The results are expressed as the mean $\pm$ S.D. of the gray value from 20–30 different nuclei or at least three different areas of the CA1 cell layer. Alternatively, immunofluorescence was quantified in the whole cell body of neurons from the CA1 subfield. For each antibody, the same settings were used for immunofluorescence acquisition in 3-, 5-, and 7-month-old THY-Tau22 mice and 7-month-old WT mice.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining

TUNEL staining was conducted on tissue slices according to the manufacturer's instructions and previously described in (Violet et al., 2014).

RNAse treatment

RNAse treatment of brain slices was performed according to Violet et al., 2014. Brain slices from heat-stressed KO-Tau mice were incubated with DNase-free RNAse (0.5 mg/mL, 3 h, Roche), RNAse-free DNase (0.2 mg/mL, 3 h, Millipore #17-141 h) or a mixture of DNase/RNAse prior to the TUNEL assay.

Cytoplasmic and nuclear fractionation of mouse brains

Cytoplasmic and nuclear fractions were obtained from mouse brains according to Violet et al., 2014.

CA1 isolation from brain slices

Mouse brains were quickly removed, placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 23 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂ and 25 mM glucose) and continuously oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4). Transverse brain slices (400 µm) were cut using a vibratome (Leica, Wetzlar, Germany). For each slice, the CA1 region was dissected using a scalpel under a binocular loupe (Leica MZ75) prior to subcellular fractionation.

Electrophoresis and immunoblotting

Electrophoresis and immunoblotting were performed according to Sultan et al. 2011 using a Tau C-terminal antibody (Galas et al. 2006). The results are expressed as the means ± S.E.M. of three different mice. ImageJ software was used for quantification.

Statistics

For immunoblotting and immunofluorescence analysis, Student's *t*-test (BiostaTGV software, Jussieu, France) was used to determine the significance (*p* value) between groups. A *p*-value <

0.05 was considered to indicate a significant difference.

Results

Hyperthermic stress promotes nucleic acid damage selectively in neurons presenting early Tau pathology

We analyzed the impact of mild, moderate and severe Tau pathology on nuclear nucleic acid integrity under physiological and HS conditions in CA1 hippocampal neurons from 3-, 5-, and 7-month-old THY-Tau22 mice (Shindowski et al., 2006) as well as 7-month-old WT littermate mice.

We first monitored by immunolabeling the level of Tau pathology in CA1 neurons under physiological conditions in sagittal hippocampal sections of THY-Tau22 and WT mice using four antibodies specific to various AD-relevant Tau epitopes (AT8, pT212, MC1, and AT100). The whole neuron cell body levels of pathological Tau phosphorylation (AT8, PT212) and of early Tau misfolding (MC1), as well as the number of neurons exhibiting Tau pathology, increased from 3- to 7-months of age (schematized in Fig. 1A). In up to 5-month-old mice, only a small number of neurons displaying cytoplasmic fibrillar Tau (AT100) were observed; however, the number of AT100-labeled neurons strongly increased by 7 months. No markers indicative of Tau pathology were visible in the 7-month-old WT mice.

Nuclear nucleic acid integrity was analyzed using a TUNEL assay and imaged by laser scanning confocal microscopy in CA1 sagittal sections (Violet et al., 2014). The quantification of nuclear TUNEL fluorescence revealed a specific HS-induced increase in nucleic acid breaks in CA1 cell nuclei from 5-month-old THY-Tau22 mice ($\approx$ 4-fold in 5-month-old THY-Tau22 HS vs. 5-month-old THY-Tau22 C) (Fig. 1B). Interestingly, when we combined the TUNEL assay with AT100 immunolabeling in CA1 sagittal sections from 5- and 7-month-old THY-Tau22 mice, HS-induced TUNEL labeling was strictly observed in neurons lacking AT100 labeling (Fig. 1C, open arrowhead). Conversely, a lack of TUNEL staining was consistently observed in the neuronal nuclei exhibiting strong cytoplasmic AT100 labeling (Fig. 1C, plain arrowhead).

In AD brains, DNA and RNA damage has been detected by immunolabeling the nucleic acid oxidation biomarkers 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and 8-hydroxy-guanosine (8-

OHG), respectively (Moreira et al., 2008; Nunomura et al., 2012). To examine the involvement of oxidation in the HS-induced nucleic acid fragmentation observed in CA1 neurons (Fig. 1C), we combined the TUNEL assay with 8-OHdG/8-OHG (8-OH(d)G) immunolabeling in CA1 sagittal sections from 5- and 7-month-old THY-Tau22 mice (Fig. 1D). Robust co-localization between the two immunolabeling treatments (open arrows) was observed in neurons, whereas no 8-OH(d)G labeling was detected in TUNEL-negative neurons (closed arrows). These results support our hypothesis that HS induces oxidative stress-related nucleic acid fragmentation *in vivo* in CA1 neuron nuclei and that this effect occurs exclusively during the early stages of Tau pathology.

As observed in Fig. 1E, no cell death was induced by HS in 5-month-old THY-Tau22 CA1 neurons.

HS-induced TUNEL staining was observed not only in the nucleus but also in the cytoplasm of CA1 neurons (Fig. 2). As the TUNEL assay is based on the fluorochrome labeling of 3'OH-termini resulting from DNA and RNA breaks, we next investigated the possibility that the cytoplasmic TUNEL staining and part of the nuclear TUNEL staining could correspond to RNA strand fragmentation, as has been shown previously (Violet et al., 2014). To this end, hippocampal sagittal sections from HS 5-month-old THY-Tau22 mice were incubated with high concentrations of DNase-free RNase or RNase-free DNase prior to TUNEL labeling. RNase pre-treatment completely abolished cytoplasmic TUNEL staining, whereas DNase pre-treatment only partially eliminated nuclear TUNEL staining. This result occurred despite the complete disappearance of DAPI staining, indicating total DNA degradation. These results suggest that HS induced both DNA and RNA breaks in the cytoplasm and nuclei of CA1 neurons from 5-month-old THY-Tau22 mice. However, as RNA integrity has been analyzed in an indirect way, further experiments like mass spectrometry would be necessary to confirm the alteration of RNA in THY-Tau22 mice.

Together, these results show the existence of an early and limited time window for DNA and RNA vulnerability to hyperthermia-induced oxidative stress during Tau pathology progression prior to the appearance of Tau fibrils.

Hyperthermic stress increases Tau phosphorylation in nucleic acid-damaged neurons

To characterize the development of nuclear Tau pathology in neurons displaying nucleic acid damage, sagittal sections of the CA1 subfield from 5-month-old THY-Tau22 mice with or without HS treatment were subjected to both a TUNEL assay and immunolabeling with AT8 or PT212 (Tau phosphorylation), MC1 (early Tau misfolding) or AT100 (fibrillar Tau) antibodies. The AT8, PT212, MC1, and AT100 stainings were quantified in CA1 nuclei (Fig. 3A, B). The increase in TUNEL staining that was observed following HS was associated with an increase in pathological Tau phosphorylation labeling in the nuclei of CA1 neurons, as determined by AT8 (1.9-fold 5-month-old THY-Tau22 HS vs. 5-month-old THY-Tau22 C) and PT212 (3.3-fold 5-month-old THY-Tau22 HS vs. 5-month-old THY-Tau22 C) staining. On the contrary no significant increase of Tau phosphorylation, as determined by AT8 and PT212 staining, was observed in 3-month-old THY-Tau22 after HS (Fig. 3B). A slight but not significant increase in early Tau misfolding was detected using MC1 antibodies. In contrast, HS did not promote the formation of fibrillar Tau (AT100) in neurons displaying nucleic acid damage; this result is in agreement with those shown in Fig. 1C. Together, these results indicated that HS increased early Tau phosphorylation and possibly misfolding in neuronal nuclei, and this effect occurred in parallel to nucleic acid damage (Fig. 3B).

To analyze the development of Tau pathology in the neuronal somata more globally, AT8, PT212, MC1, and AT100 staining levels were quantified in the entire CA1 cellular layer from 5-month-old THY-Tau22 mice (Fig. 3C). Similar HS-induced effects on Tau phosphorylation (AT8, PT212), misfolding (MC1) and fibrillization (AT100) were observed in the whole cell body as were observed in the neuronal nuclei. These results indicate that HS increases Tau phosphorylation and potentially Tau misfolding without affecting Tau fibrillization in both the nuclei and somata of CA1 neurons from 5-month-old THY-Tau22 mice.

To determine whether the HS-induced increase in nuclear Tau phosphorylation was related to increased levels of Tau in neuronal nuclei, immunolabeling in the CA1 subfield of 5-month-old THY-Tau22 mice was performed using a phospho- and conformation-independent Tau (total Tau) antibody. As shown in Fig. 3D, no significant changes in nuclear fluorescence for Tau was observed after HS, suggesting that the HS-induced increase in Tau phosphorylation

observed in Figure 3 was not related to an increase in the nuclear distribution of Tau in these neurons.

However, in THY-Tau22 neurons, the nuclear Tau immunofluorescence quantified in Fig. 3D primarily reflected the level of overexpressed transgenic human Tau (hTau) and possibly masked subtle changes in the nuclear level of murine endogenous Tau (mTau). Therefore, to analyze the effect of HS on the nuclear localization of both mTau and of hTau, their respective levels were quantified by immunoblotting following cellular fractionation of isolated CA1 subfields from 5-month-old THY-Tau22 and 7-month-old WT mice exposed or not exposed to HS. Immunoblotting using a total Tau antibody was performed in nuclear extracts (Fig. 3E). Quantification of the results in WT CA1 neurons indicates that HS promoted the nuclear accumulation of mTau, as has been previously reported for the entire hippocampus (Violet et al., 2014). In contrast, HS did not significantly modify the level of mutated hTau in nuclear extracts of CA1 cells from 5-month-old THY-Tau22 mice. These results together indicate that the global level of Tau (mTau+hTau) did not vary, confirming the immunofluorescence results (Fig. 3D).

Hyperthermia induces nucleic acid damage exclusively in neurons exhibiting prefibrillar Tau oligomers

Based on the intriguing association between early Tau pathology and nucleic acid damage, we next hypothesized that prefibrillar Tau oligomers may be related to nucleic acid alterations. The ability of HS to induce Tau oligomerization *in vivo* was tested by immunohistochemical analysis and confocal microscopy using TOC1 and T22 antibodies that selectively recognize prefibrillar Tau oligomers (Patterson et al, 2011; Lasagna-Reeves et al, 2011). TOC1 (Fig. 4A) and T22 (Fig. 4B) immunolabeling levels were quantified in the nuclei of CA1 neurons from 7-month-old WT and 3-, 5- and 7-month-old THY-Tau22 mice. HS selectively induced a strong increase in prefibrillar Tau oligomers in CA1 neurons from 5-month-old THY-Tau22 mice (TOC1: 2.7-fold HS vs. C; T22: 5.6-fold HS vs. C).

To analyze the effect of HS on Tau oligomerization in the neuronal somata more globally, T22 labeling was quantified in the entire CA1 cellular layer from 5-month-old THY-Tau22 mice. A similar HS-induced increase in prefibrillar Tau oligomers was observed in the cell body and in the nuclei (T22: 1.9-fold HS vs. C) (Fig. 4C).

To test the potential relationship between HS-induced Tau oligomers and nucleic acid alterations, TUNEL staining was performed in combination with TOC1 or T22 immunolabeling treatments in sagittal sections of CA1 from 5-month-old THY-Tau22 mice. Fig. 4D shows that HS-induced Tau oligomers were exclusively associated with TUNEL-positive staining, both in the nucleus and the cytoplasm.

These results indicated a close relationship between the HS-induced generation of prefibrillar Tau oligomers and nucleic acid alterations under HS in the nuclei and cytoplasm of CA1 neurons at early stages of Tau pathology.

Importantly, a similar co-localization between prefibrillar Tau oligomers (T22) and oxidative nucleic acid damage (8-OH(d)G) was observed in the cortex of the AD brain (Fig. 5).

MB reduces hyperthermia-induced Tau oligomerization and nucleic acid damage

The effect of MB pretreatment on the level of HS-induced prefibrillar Tau oligomers and nucleic acid damage was analyzed. Five-month-old THY-Tau22 mice received an intra-peritoneal injection of either a low dose (4 mg/kg) of MB (Deiana et al., 2009) or PBS for 30 minutes before HS (Fig. 6A). The ability of HS to induce an increase in nuclear soluble Tau oligomers in CA1 neurons was analyzed using the T22 antibody and quantified by laser confocal microscopy. MB pretreatment strongly inhibited HS-induced Tau oligomers accumulation in CA1 neuronal nuclei (2,8-fold THY-Tau22 HS+MB vs. THY-Tau22 HS+PBS) (Fig. 6B).

The effect of MB on nucleic acid integrity was further analyzed. TUNEL staining was combined with T22 immunolabeling in CA1 sagittal sections from 5-month-old THY-Tau22 mice in C or HS conditions after injection of MB or PBS (Fig. 6C). MB pretreatment prevented the nuclear accumulation of TUNEL staining (2, 4-fold THY-Tau22 HS+MB vs. THY-Tau22 HS) (Fig. 6C, D) as well as Tau oligomerization (Fig. 6B).

In parallel, 8-OH(d)G labeling was performed in sagittal sections of CA1 from 5-month-old THY-Tau22 mice under C or HS conditions after injection of MB or PBS (Fig. 6E). MB clearly prevented the HS-induced increase in 8-OH(d)G labeling in CA1 neurons.

Discussion

Stress-induced ROS production promotes Tau oligomerization

Although prefibrillar Tau oligomers have emerged as the pathogenic species in AD, the pathological mechanisms driving Tau oligomerization *in vivo* are poorly understood (Hawkins et al. 2013; Blair et al. 2013). Oxidative stress, previously described as an important player in AD pathogenesis (Sutherland et al. 2013), has been reported to induce Tau aggregation *in vitro* and in cellular models (Reynolds et al. 2005; Vanhelmont et al. 2010). Using two recently described antibodies, TOC1 and T22, which specifically recognize prefibrillar Tau oligomers (Ward et al. 2013; Lasagna-Reeves et al. 2012), we demonstrated that mild hyperthermia, which produces substantial oxidative damage (Violet et al., 2014), can catalyze nuclear and cytoplasmic Tau oligomerization *in vivo* in hippocampal neurons with early Tau pathology. Furthermore, hyperthermia-induced Tau oligomerization correlated with an increase in Tau phosphorylation, supporting the previously reported role of phosphorylation in Tau oligomerization (Crowe et al., 2013; Tepper et al., 2014).

Immunotherapeutic and chemical (Hosokawa et al. 2012; Guerrero-Munoz et al. 2014, Castillo-Carranza et al., 2014) strategies have identified Tau oligomers as promising therapeutic targets in the battle against the development of AD. MB, a phenothiazine derivative that is able to cross the blood-brain-barrier, has been used for decades to treat a broad range of afflictions (Guerrero-Munoz et al., 2014; Gerson et al., 2014). Recently, its ability at low, non-toxic doses to inhibit Tau aggregation in the brains of mouse models (O’Leary et al., 2010; Hosokawa et al., 2012; Congdon et al., 2012; Stack et al., 2014) generated substantial interest in the use of MB as a potential therapeutic agent in AD treatment. However, a lack of beneficial effects of MB on existing NFT in a triple transgenic model developing both Tau and Abeta pathologies has been reported (Spires-Jones, 2014) and MB promoted Abeta aggregation *in vitro* (Necula et al., 2007) making the use of MB controversial.

Here, we showed that MB inhibits hyperthermia-induced accumulation of prefibrillar Tau oligomers, suggesting that it prevents Tau oligomerization through chemical modification and/or direct interaction, as has been reported *in vitro* (Akouri et al., 2013). However, MB can prevent Tau polymerization through oxidative stress inhibition given that MB has been previously reported to have antioxidant properties in the brain (Rojas et al., 2012; Stack et al., 2014).

Although discrepancies exist regarding the capacity of MB to clear detergent-insoluble pathological Tau in mouse models (Spires-Jones et al., 2014), our results highlight a preventive effect of MB in combating pathological oligomeric forms of Tau *in vivo*. The ability of MB to prevent oxidative stress-induced prefibrillar Tau oligomerization reinforces the hypothesis that this compound has the potential to combat early stage Tau pathology progression in AD and other tauopathies (Baddeley et al., 2014).

The accumulation of Tau oligomers was never concomitant to the presence of fibrillar Tau pathology. The absence of small oligomeric forms in neurons containing cytoplasmic fibrillar Tau (based on AT100 labeling) suggests that newly formed Tau oligomers may be rapidly trapped by these larger aggregates, and therefore participate to the development of Tau pathology, or that ROS production in these neurons is insufficient to trigger Tau oligomerization. Interestingly, in AD brains, the expression of the antioxidant enzyme hemoxygenase is closely tied to phosphorylated forms of Tau (Takeda 2004) and a reduction of oxidative nucleic acid damage has been reported in NFT containing neurons (Nunomura, 2001).

Hyperthermia did not induce a global increase in Tau in the nuclei of THY-Tau22 CA1 neurons, contrary to what was observed in WT neurons (Violet et al., 2014). This result suggests that Tau oligomerization prevents the ability of Tau to translocate from the cytoplasm to the nucleus. Therefore, the increase in nuclear Tau oligomers is likely related to the *in situ* oligomerization of Tau within the nuclear compartment.

These results strongly support the hypothesis that an increase in oxidative stress is a driving force in Tau oligomerization in the nucleus and cytoplasm during the early stages of AD pathogenesis. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that additional hyperthermic stress-induced effects may be involved in our model. Interestingly, oxidative stress has been previously described to interfere with Abeta oligomerization in an APP transgenic mouse model of AD (Murakami et al. 2011) and may play similar catalyzing roles in the formation of the deleterious oligomeric forms of Tau and Abeta, the two key actors in AD.

Prefibrillar Tau oligomers are associated with nucleic acid alteration

The deleterious effects of Tau oligomers have been widely associated with several neuronal dysfunctions, such as altered membrane integrity (Flach et al. 2012), dysfunctional ubiquitin-proteasome systems (Tai et al. 2012), altered synaptic and mitochondrial functions (Lasagna-Reeves et al., 2011) and cognitive decline early in the disease (Mufson et al., 2014).

We previously described the ability of Tau to protect the integrity of nucleic acids *in vivo* under physiological and hyperthermic conditions in hippocampal neurons (Violet et al. 2014). The present study suggests that the accumulation of prefibrillar Tau oligomers alters nucleic acid integrity under ROS-producing stress conditions (Violet et al. 2014). From these results, we hypothesize that Tau oligomers may participate in the accumulation of oxidative DNA and RNA damage in the AD brain during the early pathological stages by inhibiting Tau's physiological nucleic acid protective function.

Our results further highlight the non-harmful effect of fibrillar Tau on nucleic acid integrity, contrary to the deleterious impact of prefibrillar Tau oligomers.

The underlying mechanisms that link Tau oligomers to nucleic acid damage remain to be identified. However, we and others have reported that Tau interacts with DNA (Sjoberg et al. 2006; Wei et al. 2008; Sultan et al. 2011). The dysregulation of the interaction between Tau and DNA has been proposed to play an important role in the etiology of AD. Camero et al. showed that Tau monomers and small oligomers interacted with DNA *in vitro* (Camero et al. 2013), whereas aggregation impaired Tau-DNA binding capacity (Hua and He 2002; Camero et al. 2013). We can therefore speculate that the dysregulation of the interaction between Tau and DNA may be involved in the accumulation of DNA damage observed in the AD brain although the underlying mechanism has to be demonstrated. Furthermore, hyperphosphorylation has been shown to alter Tau-mediated DNA protection against ROS *in vitro* (Lu et al., 2014). Therefore, the increase in Tau phosphorylation observed after HS in neuronal nuclei displaying Tau oligomers could be involved in the alteration of DNA integrity.

Similarly, Tau is an RNA-binding protein (Kampers et al., 1996), and Tau oligomers could impair the Tau-RNA interaction. Further experiments are necessary to elucidate the underlying mechanisms of Tau oligomers-induced nucleic acid alteration.

Alternatively, Tau binding to RNA and DNA *in vitro* has been shown to accelerate the formation of Tau filaments (Kampers et al. 1996; Hisokou et al. 2007), showing that nucleic acids could participate in the polymerization process. Consequently, Tau and nucleic acids might act synergistically to contribute to Tau oligomerization under oxidative stress conditions.

Accumulated DNA damage has recently been associated with cognitive decline in neurodegenerative disorders (Borgesius et al. 2012). Interestingly, hyperthermia has been linked to memory impairment (Racinais et al. 2008; Jiang et al. 2013) in humans and to a worsening of AD pathology (Fabiszewski et al. 1990). From our data, it is tempting to speculate that an increase in Tau oligomer-induced nucleic acid alterations might be involved in these phenomena.

Conclusions

In summary, our results identified an early and critical time window during the development of Tau pathology, for hyperthermia-induced Tau oligomerization, an effect that most likely occurs via an increase in oxidative stress. The results also indicate DNA and RNA vulnerability during the progression of Tau pathology and preceding the formation of Tau fibrils. These findings imply the existence of a short therapeutic window during which it may be possible to prevent and/or reverse the formation of harmful Tau oligomers and therefore block, or at least slow, the progression of Tau pathology.

Acknowledgments

This article is dedicated to Pr. Lester Binder (2013.11.15), who has been a pioneer in the nuclear Tau study. Many thanks to ML. Caillet-Boudin for supportive discussions and D. Tondeleir for critically reading the manuscript. We are grateful to the IMPRT (Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Lille) for access to the confocal microscopy platform and the animal facility. We thank M. Besegher, I. Brion, D. Cappe, J. Devassine, Y. Lepage, and D. Taillieu for animal care and D. Blum for animal management. We thank MH. Gevaert and RM. Siminski (Laboratoire d'histologie, Faculté de Médecine, Lille), M. Sendid, N. Zommer, C. Bournonville and S. Carrier for technical assistance. We express gratitude to Alzheimer's disease patients and their families who allowed us to perform brain autopsies. This study was principally supported by French government funding from the Agence Nationale de la Recherche MALZ EPITAUDNA grant and in part by LabEx (Excellence Laboratory),

DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer's Disease), INSERM (Institut National de la santé et de la recherche médicale), LMCU (*Lille Métropole Communauté urbaine*), Région Nord/Pas-de-Calais, and FEDER (Fonds Européen de Développement Economique et Régional).

The authors declare no conflict of interest.

References

- Akoury E, Pickhardt M, Gajda M, Biernat J, Mandelkow E, Zweckstetter M (2013) Mechanistic basis of phenothiazine-driven inhibition of Tau aggregation. *Angew Chem Int Ed Engl* 18;52(12):3511-3515.
- Baddeley TC, McCaffrey J, Storey JM, Cheung JK, Melis V, Horsley D, Harrington CR, Wischik CM (2014) Complex Disposition of Methylthioninium Redox Forms Determines Efficacy in Tau Aggregation Inhibitor Therapy for Alzheimer's Disease. *J Pharmacol Exp Ther* in press.
- Blair LJ, Nordhues BA, Hill SE, Scaglione KM, O'Leary JC 3rd, Fontaine SN, Breydo L, Zhang B, Li P, Wang L, Cotman C, Paulson HL, Muschol M, Uversky VN, Klengel T, Binder EB, Kaye R, Golde TE, Berchtold N, Dickey CA (2013) Accelerated neurodegeneration through chaperone-mediated oligomerization of tau. *J Clin Invest* 123:4158-4169.
- Borgesius NZ, de Waard MC, van der Pluijm I, Omrani A, Zondag GC, van der Horst GT, Melton DW, Hoeijmakers JH, Jaarsma D, Elgersma Y (2011) Accelerated age-related cognitive decline and neurodegeneration, caused by deficient DNA repair. *J Neurosci* 31:12543-12553.
- Bradey-Whitman MA, Timmons MD, Beckett TL, Murphy MP, Lynn BC, Lovell MA (2014) Nucleic Acid Oxidation: An early feature of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 128:294-304.
- Camero S, Benítez MJ, Barrantes A, Ayuso JM, Cuadros R, Avila J, Jiménez JS (2013) Tau Protein Provides DNA with Thermodynamic and Structural Features which are Similar to those Found in Histone-DNA Complex. *J Alzheimers Dis*.39(3):649-660.
- Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Muñoz MJ, Lasagna-Reeves CA, Gerson JE, Singh G, Estes DM, Barrett AD, Dineley KT, Jackson GR, Kaye R (2014) Passive immunization with Tau oligomer monoclonal antibody reverses tauopathy phenotypes

- without affecting hyperphosphorylated neurofibrillary tangles. *J Neurosci* 34(12):4260-4272.
- Congdon EE, Wu JW, Myeku N, Figueroa YH, Herman M, Marinec PS, Gestwicki JE, Dickey CA, Yu WH, Duff KE (2012) Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy* 8:609-622.
- Cooper-Knock J, Kirby J, Ferraiuolo L, Heath PR, Rattray M, Shaw PJ (2012) Gene expression profiling in human neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 8:518-530.
- Crowe A, James MJ, Lee VM, Smith AB 3rd, Trojanowski JQ, Ballatore C, Brunden KR (2013) Aminothienopyridazines and methylene blue affect Tau fibrillization via cysteine oxidation. *J Biol Chem* 288(16):11024-11037.
- Deiana S, Harrington CR, Wischik CM, Riedel G (2009) Methylthioninium chloride reverses cognitive deficits induced by scopolamine: comparison with rivastigmine. *Psychopharmacology* 202:53-65.
- Fabiszewski KJ, Volicer B, Volicer L (1990) Effect of antibiotic treatment on outcome of fevers in institutionalized Alzheimer patients. *JAMA* 263 : 3168-3172.
- Flach K, Hilbrich I, Schiffmann A, Gartner U, Kruger M, Leonhardt M, Waschipky H, Wick L, Arendt T, Holzer M (2012) Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. *J Biol Chem* 287:43223-43233.
- Galas MC, Dourlen P, Bégard S, Ando K, Blum D, Hamdane M, Buée L (2006) The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *J Biol Chem* 281:19296-19304.
- Gerson JE, Castillo-Carranza DL, Kaye R (2014) Advances in therapeutics for neurodegenerative tauopathies: moving toward the specific targeting of the most toxic tau species. *ACS Chem Neurosci* 5(9):752-69.
- Guerrero-Muñoz MJ, Castillo-Carranza DL, Kaye R (2014) Therapeutic approaches against common structural features of toxic oligomers shared by multiple amyloidogenic proteins. *Biochem Pharmacol* 88:468-748.
- Hawkins BE, Krishnamurthy S, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Prough DS, Jackson GR, Dewitt DS, Kaye R (2013) Rapid Accumulation of Endogenous Tau Oligomers in a Rat

- Model of Traumatic Brain Injury: Possible Link Between TBI and Sporadic Tauopathies. *J Biol Chem* 288(23):17042-17050.
- Hikosou R, Kurabayashi Y, Doumoto M, Hoshitoku K, Mizushima F, Minoura K, Tomoo K, Ishida T (2007) Effect of DNA on filament formation of tau microtubule-binding domain: structural dependence of DNA. *Chem Pharm Bull* 55:1030-1033.
- Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M (2012) Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One* 7:e52389.
- Hua Q, He RQ (2002) Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept Lett* 9: 349-357.
- Jiang Q, Yang X, Liu B, Li M, Qian S, Zhao L, Zhou Z, Sun G (2013) Hyperthermia impaired human visual short-term Memory : an fMRI study. *Int J Hyperthermia* 29 :219-224.
- 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 Lett* 399:344-349.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Clos AL, Jackson GR, Kayed R (2011) Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener* 6:39.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, Kayed R (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J* 26:1946-1959.
- Lu Y, He HJ, Zhou J, Miao JY, Lu J, He YG, Pan R, Wei Y, Liu Y, He RQ (2013) Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection. *J Alzheimers Dis* 37(3):551-63.
- Moreira PI, Nunomura A, Nakamura M, Takeda A, Shenk JC, Aliev G, Smith MA, Perry G (2008) Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 44(8):1493-505.
- Mufson EJ, Ward S, Binder L (2013) Prefibrillar Tau Oligomers in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Neurodegener Dis* 13(2-3):151-153.
- Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham KJ, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T (2011) SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase)

- deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286:44557-44568.
- Necula M, Breydo L, Milton S, Kaye R, van der Veer WE, Tone P, Glabe CG (2007) Methylene blue inhibits amyloid A β oligomerization by promoting fibrillization. *Biochemistry* 46(30):8850-60.
- Nunomura A, Tamaoki T, Motohashi N, Nakamura M, McKeel DW Jr, Tabaton M, Lee HG, Smith MA, Perry G, Zhu X (2012) The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 71(3):233-241.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(8):759-67.
- O'Leary JC 3rd, Li Q, Marinec P, Blair LJ, Congdon EE, Johnson AG, Jinwal UK, Koren J 3rd, Jones JR, Kraft C, Peters M, Abisambra JF, Duff KE, Weeber EJ, Gestwicki JE, Dickey CA (2010) Phenothiazine-mediated rescue of cognition in tau transgenic mice requires neuroprotection and reduced soluble tau burden. *Mol Neurodegener* 5:45.
- Paterson KR, Remmers C, Fu Y, Brooker S, Kanaan NM, Vana L, Ward S, Reyes JF, Philibert K, Glucksman MJ, Binder LI (2011) Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286:23063-23076.
- Racinais S, Gaoua N, Grantham J (2008) Hyperthermia impairs short-term memory and peripheral motor drive transmission. *J Physiol* 586 : 4751-4762.
- Reynolds MR, Berry RW, Binder LI (2005) Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 44:1690-1700.
- Rojas JC, Bruchey AK, Gonzalez-Lima F (2012) Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. *Prog Neurobiol* 96:32-45.
- Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion JP, Hamdane M, Buée L (2006) Alzheimer's disease- like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* 169:599-616.

- Sjoberg M K, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J. Cell Sci* 119, 2025–2034.
- Spires-Jones TL, Friedman T, Pitstick R, Polydoro M, Roe A, Carlson GA, Hyman BT (2014) Methylene blue does not reverse existing neurofibrillary tangle pathology in the rTg4510 mouse model of tauopathy. *Neurosci Lett* 562:63-68.
- Stack C, Jainuddin S, Elipenahli C, Gerges M, Starkova N, Starkov AA, Jové M, Portero-Otin M, Launay N, Pujol A, Kaidery NA, Thomas B, Tampellini D, Beal MF, Dumont M (2014) Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity. *Hum Mol Genet* 23(14):3716-3732.
- Sultan A, Nessler F, Violet M, Begard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Bueée L, Galas MC (2011) Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *J Biol Chem* 286:4566-4575.
- Sutherland GT, Chami B, Youssef P, Witting PK (2013) Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? *Redox Rep.* 18:134-141.
- Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spires-Jones TL, Hyman BT (2012) The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am J Pathol* 181:1426-1435.
- Takeda A, Itoyama Y, Kimpara T, Zhu X, Avila J, Dwyer BE, Perry G, Smith MA (2004) Heme catabolism and heme oxygenase in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal* 6(5):888-94.
- Tepper K, Biernat J, Kumar S, Wegmann S, Timm T, Hübschmann S, Redecke L, Mandelkow EM, Müller DJ, Mandelkow E (2014) Oligomer Formation of Tau Hyperphosphorylated in Cells. *J Biol Chem* 289(49):34389-407.
- Van der Jeugd A, Vermaercke B, Derisbourg M, Lo AC, Hamdane M, Blum D, Buée L, D'Hooge R (2013) Progressive age-related cognitive decline in tau mice. *J Alzheimers Dis* 37(4):777-788.
- Vanhelmont T, Vandebroek T, De Vos A, Terwel D, Lemaire K, Anandhakumar J, Franssens V, Swinnen E, Van Leuven F, Winderickx J (2010) Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. *FEMS Yeast Res* 10:992-1005.

- Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A, Chauderlier A, Caillierez R, Talahari S, Nesslany F, Lefebvre B, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC (2014) A major role for Tau in DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front Cell Neurosci* 8:84.
- Ward SM, Himmelstein DS, Lancia JK, Fu Y, Patterson KR, Binder LI (2013) TOC1: Characterization of a Selective Oligomeric Tau Antibody. *J Alzheimers Dis* 37(3):593-602.
- Weaver CL, Espinoza M, Kress Y, Davies P (2000) Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:719-727.
- Wei Y, Qu MH, Wang XS, Chen L, Wang DL, Liu Y, Hua Q, He RQ (2008) Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PLoS One* 3, 2600.
- Zekanowski C, Wojda U (2009) Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 69(2):232-253.
- Zheng-Fischhöfer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E (1998) Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3 β and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem* 252:542-52.

Legends

Figure 1 - Hyperthermia generates nucleic acid strand breaks and oxidative damage selectively in neuronal nuclei expressing early Tau pathology.

A, Scheme of Tau pathology progression in CA1 neurons of THY-Tau22 mice, based on observed immunofluorescence using AT8, PT212, MC1 and AT100 antibodies.

B, The effects of various stages of Tau pathology on nuclear nucleic acid integrity were detected by TUNEL assays under control (C) and HS conditions. The labeling intensity (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells from 7-month-old WT and 3-, 5- and 7-month-old THY-Tau22 mice (n = 3 for each mouse category). Tau pathology increased the average intensity level in the HS condition in 5-month-old THY-Tau22 mice. The data shown are the means $\pm$ S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$.

C, Representative images of sagittal CA1 sections from three different 5- or 7-month-old THY-Tau22 mice after HS. The sections were subjected to TUNEL assays, co-labeled with AT100, and analyzed by laser scanning confocal microscopy. The nuclei were detected with DAPI

staining. Cells displaying cytoplasmic aggregated (AT100) Tau did not show any TUNEL positive staining after HS (closed arrows). The open arrows indicate TUNEL-positive cells. The scale bars represent 20 μ m.

D, Representative images of sagittal CA1 sections from three different 5- or 7-month-old THY-Tau22 mice after HS. These sections were subjected to TUNEL assays, co-labeled with 8-OHdG antibody, and analyzed by laser scanning confocal microscopy. The nuclei were detected using DAPI staining. TUNEL-positive staining exclusively correlated with oxidative damage in 5-month-old THY-Tau22 mice (open arrows). The closed arrows indicate TUNEL-negative cells. The scale bars represent 20 μ m.

E, The quantification of DAPI-stained nuclei did not show significant changes in cell density in 5-month-old CA1 THY-Tau22 mice after HS (n = 3 for each mouse category). These data indicate that HS-generated nucleic acid damage did not promote cell death.

Figure 2 - Hyperthermia induces DNA and RNA damage in neurons with early Tau pathology.

Representative sagittal hippocampus sections from 5-month-old THY-Tau22 mice subjected to HS, pre-treated with DNase-free RNase or RNase-free DNase or not pre-treated before TUNEL staining and imaged using laser scanning confocal microscopy (n = 3 for each mouse category). RNase pre-treatment completely abolished cytoplasmic staining and reduced nuclear TUNEL staining levels. DNase pre-treatment completely abolished DAPI staining and reduced nuclear TUNEL staining. These data show that HS induced nuclear DNA and cytoplasmic/nuclear RNA damage in CA1 hippocampal neurons with Tau pathology. The scale bars represent 20 μ m.

Figure 3 - Hyperthermia promotes Tau phosphorylation in nuclear and cytoplasmic nucleic acid-damaged neurons.

A, The effect of HS on nuclear Tau pathology was detected by labeling sagittal CA1 sections from 5-month-old THY-Tau22 mice with phospho-dependent (AT8, PT212) and conformation-dependent (MC1) or fibril-dependent (AT100) antibodies under control (C) and HS conditions (n = 3 for each mouse category). The results were analyzed by laser scanning confocal microscopy. The labeling intensity (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells. HS increased pathological nuclear Tau

phosphorylation but had no significant effect on early Tau misfolding (MC1) or fibril formation (AT100). The data shown are the means $\pm$ S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$.

B, Representative images of sagittal CA1 sections from three different 3- and 5-month-old THY-Tau22 mice subjected to TUNEL assays, labeled with PT212 antibody, and analyzed by laser confocal microscopy. The nuclei were detected with DAPI staining. HS-induced TUNEL positive staining (open arrows) correlated with an increase in Tau phosphorylation labeling in 5-month-old THY-Tau22 mice. The scale bars represent 20 μ m.

C, The effects of HS on cellular Tau pathology were detected by labeling sagittal CA1 sections from 5-month-old THY-Tau22 mice with phospho-dependent (AT8, PT212), conformation-dependent (MC1) or fibril-dependent (AT100) antibodies under control (C) and HS conditions ($n = 3$ for each mouse category). The analysis was performed by laser scanning confocal microscopy. The labeling intensity (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells. HS increased pathological cellular Tau phosphorylation but had no significant effect on early Tau misfolding (MC1) or fibril formation (AT100). The data shown are the means $\pm$ S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$.

D, Global Tau levels were detected by labeling sagittal CA1 sections from WT, 3- and 5-month-old THY-Tau22 mice with total Tau antibody under control (C) or HS conditions ($n = 3$ for each mouse category); the analysis was performed using laser scanning confocal microscopy. The labeling intensity (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells. No increase in Tau levels was observed in the nuclei of TUNEL-positive cells immediately after HS in 3- and 5-month-old THY-Tau22 mice contrarily to WT.

E, Nuclear extracts of the isolated CA1 subfield from 7-month-old WT mice and 5-month-old THY-Tau22 mice in the control (C) condition and after HS ($n = 3$ for each mouse category) were analyzed by immunoblotting for total Tau. Lamin B was used as a specific nuclear marker. Densitometric analysis of total Tau (normalized to lamin B) revealed a significant increase in murine Tau in the nuclei of WT neurons and THY-Tau22 neurons under HS. HS had no effect on the human Tau levels in the nuclei of THY-Tau22 neurons. The data are shown as the means $\pm$ S.D. of three different WT and THY-Tau mice. *, $p < 0.05$.

Figure 4 - Hyperthermia-induced nucleic acid damage is associated with the accumulation of prefibrillar Tau oligomers.

Nuclear Tau oligomerization was detected by labeling sagittal CA1 sections from 7-month-old WT and 5 and 7-month-old THY-Tau22 mice under control (C) and HS conditions with TOC1 (A) and T22 (B) antibodies ($n = 3$ for each mouse category); the analysis was performed by laser scanning confocal microscopy. The labeling intensity (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells. HS selectively increased the formation of prefibrillar Tau oligomers in the nuclei of CA1 neurons from 5-month-old THY-Tau22 mice. The data shown are the means $\pm$ S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$.

C, The global cellular Tau oligomerization in sagittal CA1 sections from 5-month-old THY-Tau22 mice under control (C) and HS conditions was detected by labeling with T22 antibody ($n = 3$ for each mouse category); the analysis was performed using laser scanning confocal microscopy. The labeling intensity (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells. HS increased the formation of prefibrillar Tau oligomers in the whole cell body of CA1 neurons from 5-month-old THY-Tau22 mice. The data shown are the means $\pm$ S.D. of 20 to 30 nuclei. **, $p < 0.01$.

D, Representative images of sagittal CA1 sections from three different 5-month-old THY-Tau22 mice subjected to the TUNEL assay, labeled with TOC1 or T22, and analyzed by laser scanning confocal microscopy. The nuclei were detected with DAPI staining. HS-induced TUNEL positive staining (open arrows) correlated with an increase in Tau oligomer labeling. The closed arrows indicate TUNEL and Tau oligomer-negative cells. The scale bars represent 20 μm .

Figure 5 - Oxidative nucleic acid damage is associated with prefibrillar Tau oligomers in the AD brain.

Representative images of human brain sections from four AD patient (Braak 6) co-labeled with 8-OH(d)G and T22 antibodies; the analysis was performed by laser scanning confocal microscopy. The nuclei were detected with DAPI staining. Cytoplasmic and nuclear nucleic acid oxidative damage correlated with the accumulation of prefibrillar Tau oligomers. The scale bar represents 20 μm .

Figure 6 - MB prevents hyperthermia-induced Tau oligomerization and nucleic acid damage.

A, Schematic showing the pretreatment of 5-month-old THY-Tau22 mice with MB or PBS in physiological or hyperthermic conditions.

The effects of MB on Tau oligomerization and nucleic acid damage were respectively detected by labeling sagittal CA1 sections from 5-month-old THY-Tau22 mice under HS with a T22 antibody (B) and TUNEL staining (D) (n = 3 for each mouse category). The analysis was performed by laser scanning confocal microscopy. The labeling intensity (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells. HS selectively increased the formation of prefibrillar Tau oligomers in 5-month-old THY-Tau22 mice. The data shown are the means $\pm$ S.D. of 20 to 30 nuclei. *, $p < 0.05$.

C, Representative images of sagittal CA1 sections from three different 5-month-old THY-Tau22 mice pretreated with MB or PBS before HS or no HS (C). The sections were subjected to the TUNEL assay, labeled with T22, and analyzed by laser confocal microscopy. The nuclei were detected with DAPI staining. MB decreased the HS-induced Tau oligomer levels and nucleic acid damage. The scale bars represent 20 μ m.

E, Representative images of sagittal CA1 sections from three different 5-month-old THY-Tau22 mice pretreated with MB or PBS before HS, labeled with 8-OHdG antibody and analyzed by laser scanning confocal microscopy. The nuclei were detected using DAPI staining. MB prevented the formation of HS-induced cytoplasmic and nuclear nucleic acid oxidative damage. The scale bars represent 50 μ m.

Figure 1

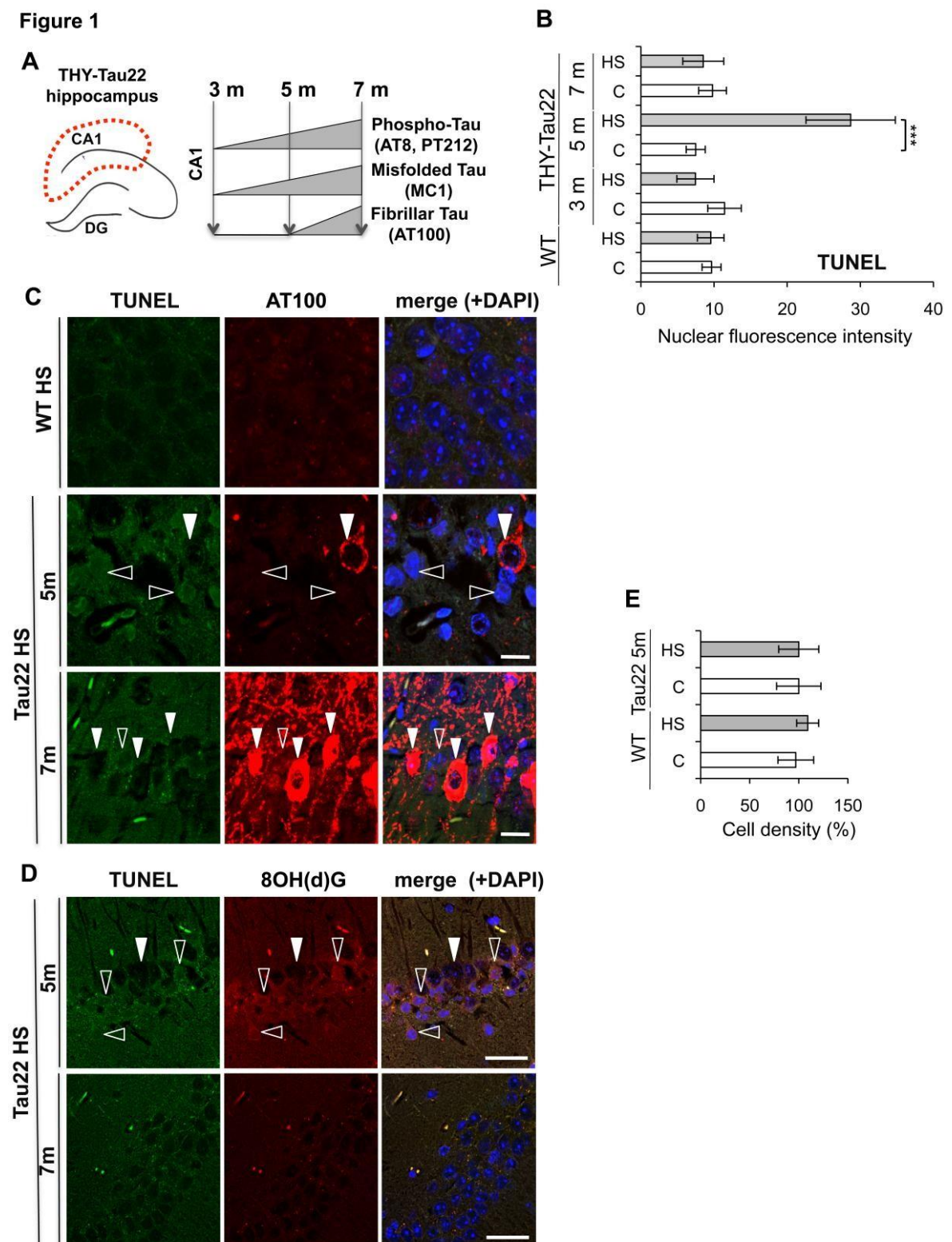


Figure 2

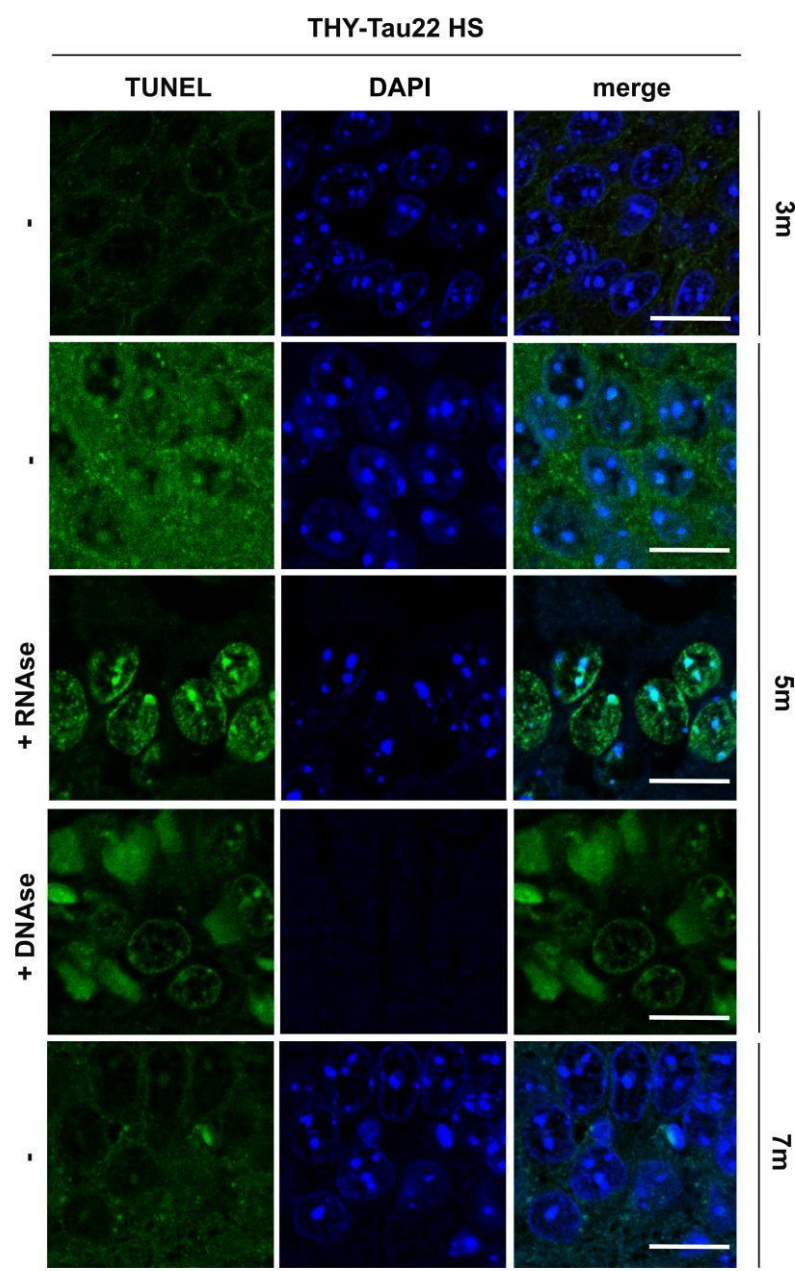


Figure 3

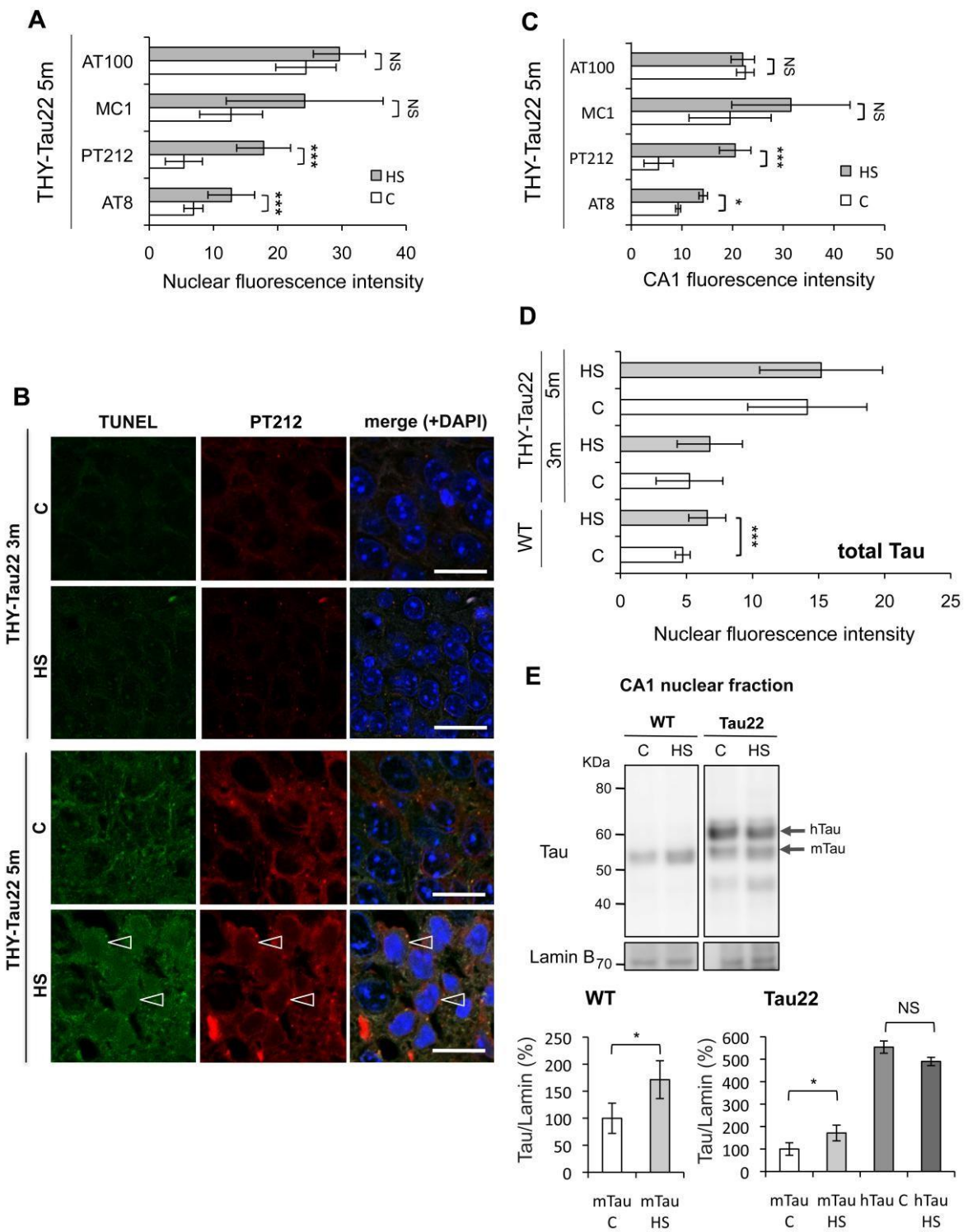


Figure 4

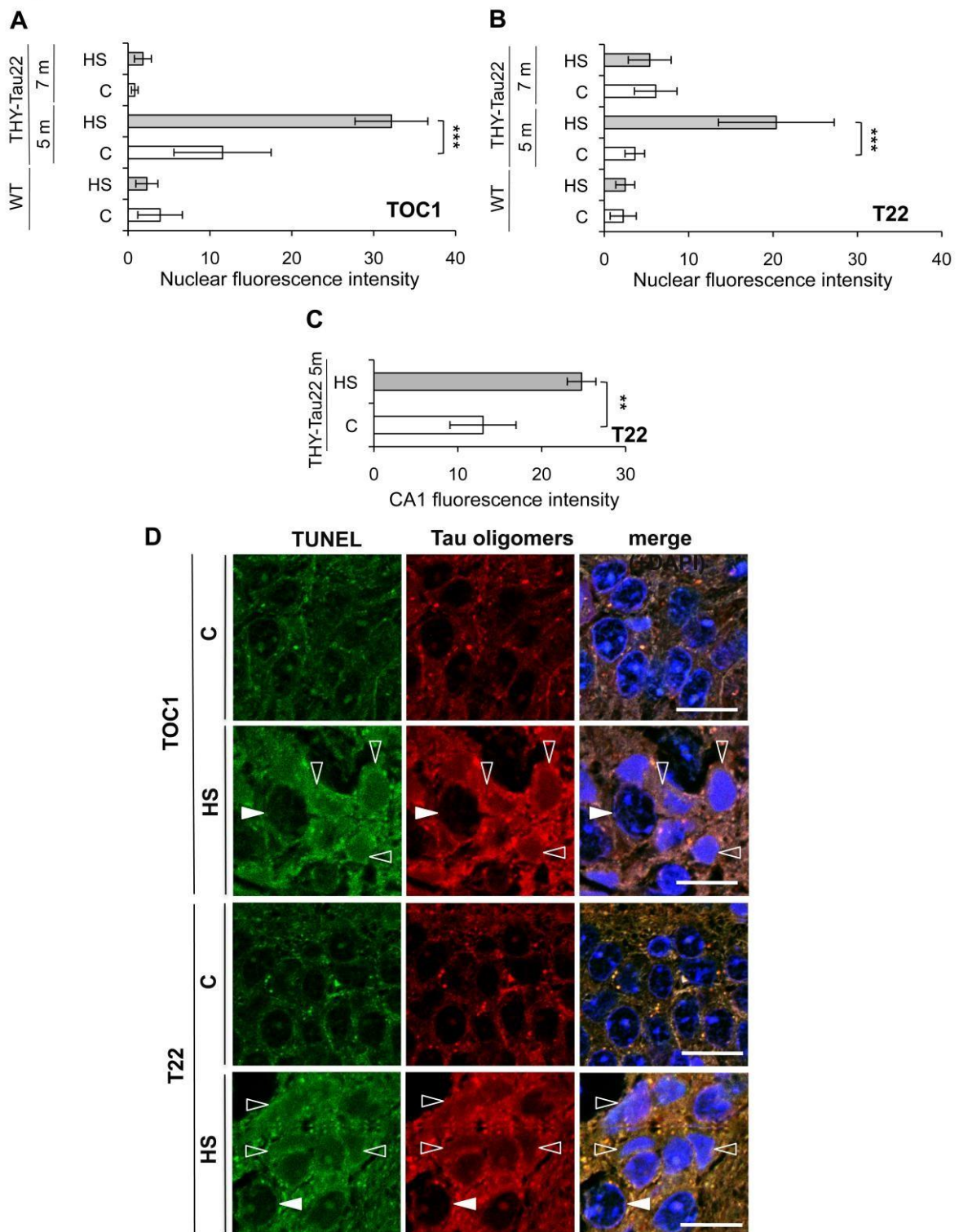


Figure 5

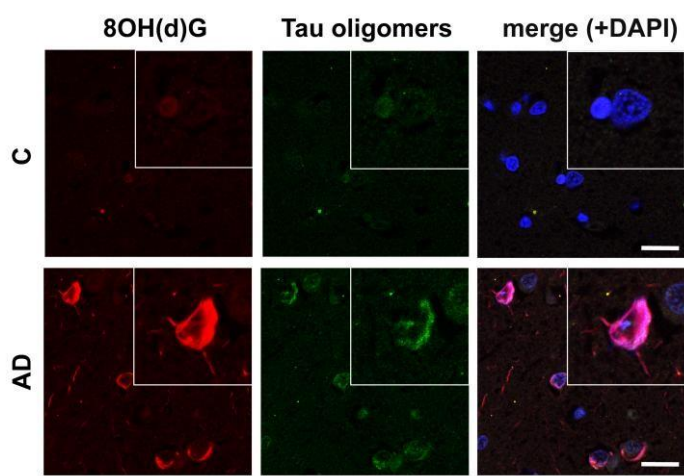
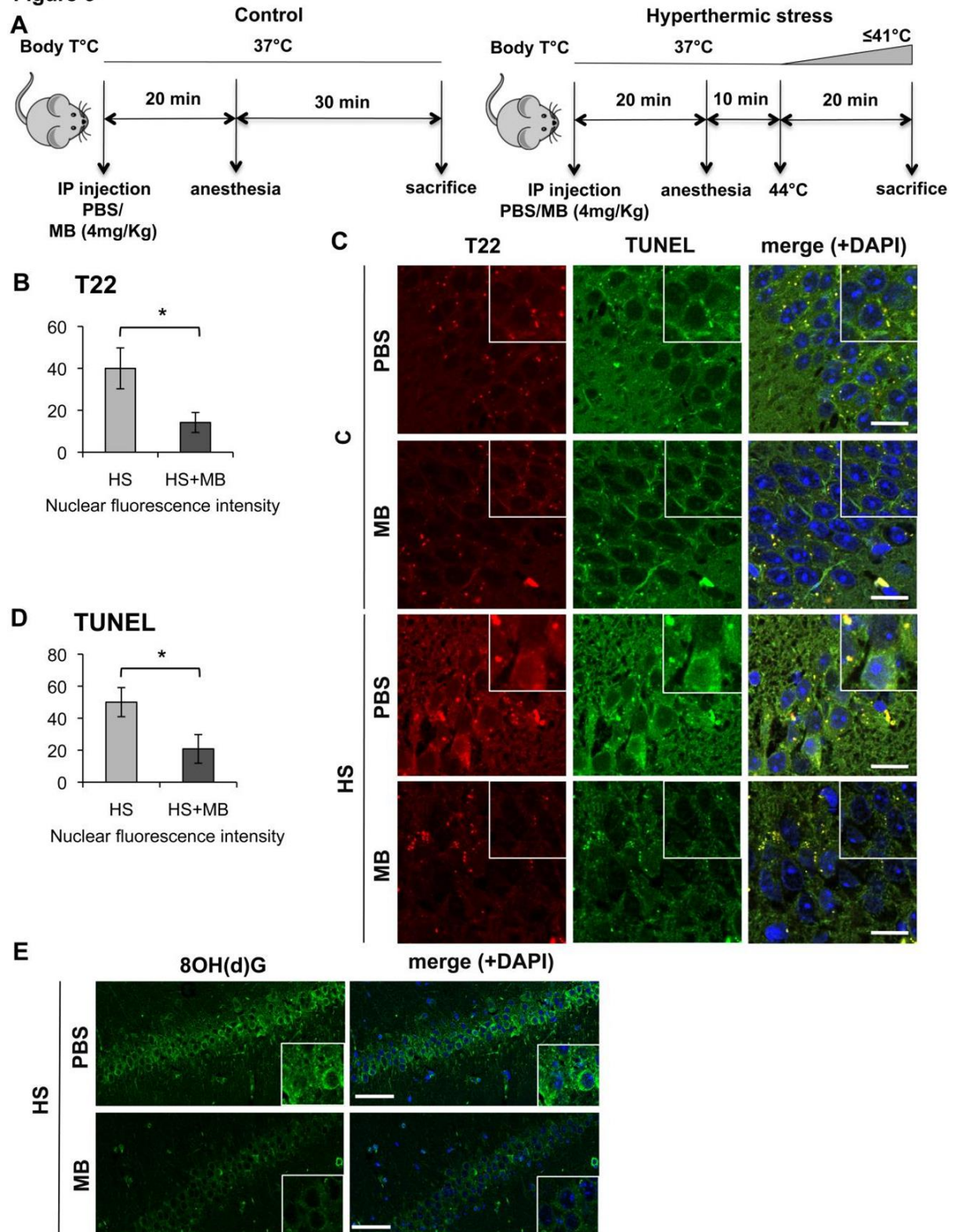
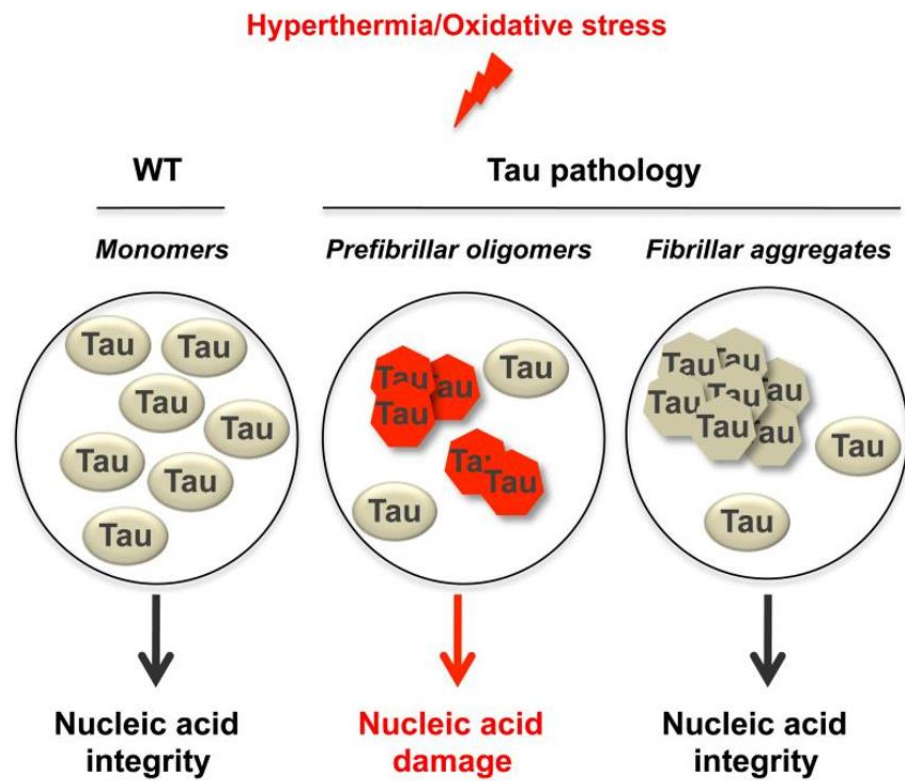


Figure 6



Graphical Abstract



C. Discussion

Notre modèle de stress hyperthermique *in vivo* induit des dommages oxydatifs (Violet et al., 2014). La souris THY-tau22, modèle transgénique de tauopathie, présente une hyperphosphorylation et agrégation progressive de Tau conduisant à l'apparition de troubles mnésiques (Schindowski et al., 2006). Cette progression fait de la THY-Tau22 un modèle intéressant lorsque l'on souhaite tester un effet à plusieurs stades de la pathologie. Ainsi, à l'aide d'anticorps spécifiques d'oligomères solubles de Tau, fournis dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Lester Binder (University of Michigan) et le Pr Rakez Kaye (University of Texas Medical Branch), nous avons pu tester l'effet du stress hyperthermique sur la production d'oligomères et les dommages aux acides nucléiques à différents stades de la pathologie.

I. Le stress oxydant induit la formation d'oligomères de Tau.

Chez les souris THY-Tau22, le stress hyperthermique induit la production d'oligomères de Tau dans des neurones présentant une pathologie Tau précoce, c'est-à-dire à un stade pré-fibrillaire de la pathologie Tau. Les mécanismes impliqués dans l'oligomérisation de la protéine Tau sont méconnus. A l'instar d'autres études, nos résultats suggèrent une implication du stress oxydant dans l'oligomérisation de Tau (Reynolds et al., 2005; Vanhelmont et al., 2010). Cet effet pourrait être indirect et passer par la phosphorylation de Tau induite par le stress oxydant. En effet, le stress oxydant joue un rôle critique dans la phosphorylation de Tau. Ce dernier augmente notamment l'activité de GSK-3 β , kinase qui cible la protéine Tau (Feng et al., 2013). Il a été montré qu'un stress oxydatif chronique induit une augmentation de la phosphorylation de Tau dans des cellules de neuroblastome (Su et al., 2010). Ces études sont en cohérence avec nos résultats. En effet, on observe une augmentation de la phosphorylation de Tau sous l'effet du stress hyperthermique. De plus, il a été montré que des produits de peroxydation des lipides facilitent la phosphorylation de Tau et l'agrégation de protéines Tau phosphorylées (Gómez-Ramos et al., 2003; Liu et al., 2005b; Gamblin et al., 2000). Néanmoins, bien que le stress hyperthermique, dans notre modèle, soit un inducteur de stress oxydant, on ne peut exclure un effet propre au stress hyperthermique dans la formation d'oligomères. Quoi qu'il en soit, nous avons développé un modèle *in vivo* d'oligomérisation de Tau. C'est un outil intéressant pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'oligomérisation et des moyens pour la prévenir.

Les neurones atteints d'une pathologie Tau avancée, contenant des fibres de Tau ne développent pas d'oligomères sous l'effet du stress hyperthermique. Cela suggère que les agrégats insolubles de Tau piègeraient les oligomères nouvellement formés. D'après cette hypothèse, les agrégats insolubles seraient une réponse à l'action délétère des oligomères, ils auraient pour but d'absorber, de neutraliser les composés toxiques et de retarder la mort neuronale (Cowan and Mudher, 2013). Cette hypothèse de la toxicité des oligomères plutôt que des agrégats est cohérente avec le second fait saillant mis en lumière par cette étude.

II. La présence d'oligomères de Tau est corrélée aux dommages aux acides nucléiques.

Un nombre croissant d'études pointent les oligomères comme les formes toxiques de Tau (Lasagna-Reeves et al., 2010, 2011, Flach et al., 2012, Tian et al., 2013). Cependant, les mécanismes impliqués dans la toxicité des oligomères restent obscurs. Une action délétère des oligomères de Tau a été rapporté au niveau de la membrane cellulaire (Flach et al., 2012), du compartiment synaptique et de la mitochondrie (Berger et al., 2007; Lasagna-Reeves et al., 2011). Au vu du rôle protecteur de Tau vis-à-vis des acides nucléiques, quel effet son oligomérisation a-t-elle sur l'intégrité de ces acides nucléiques ?

Nos résultats montrent que les dommages aux acides nucléiques induits par le stress hyperthermique sont strictement corrélés à la présence d'oligomères de Tau, suggérant un rôle délétère des oligomères sur l'intégrité des acides nucléiques. Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation des dommages oxydatifs observés aux stades précoces de la maladie d'Alzheimer (Bradley-Whitman et al., 2014; Nunomura et al., 2012).

Afin de tester l'implication des oligomères de Tau sur les dommages aux acides nucléiques. Nous avons, préalablement au stress hyperthermique, injecté les souris avec du bleu de méthylène en intrapéritonéal. Le bleu de méthylène est un dérivé de phénothiazine découvert au cours de la deuxième moitié du 19^{ème} siècle. Premier médicament synthétique, il a été utilisé pour lutter contre de nombreuses maladies telles que la malaria ou les infections urinaire (Schirmer et al., 2011). Il s'agit d'une molécule anti-oxydante, inhibitrice de l'agrégation de Tau (Taniguchi et al., 2005; Wischik et al., 1996). Elle est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (O'leary et al., 1968). Des études menées dans des modèles transgéniques ont mis en évidence sa capacité à inhiber l'agrégation de Tau, *in vivo*, dans des modèles murins

(Hosokawa et al., 2012; O’Leary et al., 2010; Stack et al., 2014). Nos résultats montrent que le traitement au bleu de méthylène prévient l’oligomérisation de Tau et les dommages induits aux acides nucléiques par le stress hyperthermique. Ces résultats suggèrent que les oligomères de Tau sont délétères vis-à-vis de l’intégrité des acides nucléiques. On ne peut conclure de façon péremptoire sur le mécanisme d’action du bleu de méthylène dans notre modèle. Son impact sur l’oligomérisation peut résulter de ses capacités anti-agrégatives ou de ses propriétés anti-oxydantes.

Les mécanismes impliqués dans la perte de fonction protectrice de Tau vis-à-vis des acides nucléiques ne sont pas identifiés. Tau est capable d’interagir avec l’ADN. Or, des études réalisées *in vitro* ont mis en évidence la perte d’interaction de l’ADN avec Tau lorsque celle-ci est phosphorylée (Hua et al., 2000, Lu et al., 2013b, Camero et al., 2014, Qi et al., 2015). De manière intéressante, il a été montré *in vitro* que la protéine Tau phosphorylée perd sa capacité à protéger l’ADN de la dénaturation thermique ainsi que des attaques oxydatives (Lu et al., 2013b). Tau interagit également avec l’ARN (Kampers et al., 1996; Wang et al., 2006b). L’interaction entre l’ARN et la protéine Tau hyperphosphorylée, n’a pas été investiguée à ce jour. La perte d’interaction de Tau phosphorylée avec l’ADN pourrait être impliqué dans cette perte de fonction protectrice.

Les conséquences de la perte de fonction de Tau peuvent être dramatiques et participer au processus neurodégénératif. L’accumulation de dommages de types oxydatifs à l’ADN a pu être observé à plusieurs reprises, chez l’Homme, la souris ou le rat au cours du vieillissement. A titre d’exemple, chez le rat, une augmentation de cassures simple-brin, double-brin ou de bases modifiées 8-OHdG s’opère au cours du vieillissement (Swain and Subba Rao, 2011). Chez l’Homme, une étude a analysé le profil transcriptomique d’humains de 26 à 106 ans à partir du cortex cérébral. Ils ont mis en évidence un groupe de gènes impliqués notamment dans la réparation de l’ADN, la plasticité synaptique et la fonction mitochondriale dont l’expression est réduite avec l’âge. Ils corrélaient cette diminution de l’expression avec une vulnérabilité plus importante de leurs promoteurs respectifs aux dommages induits par le stress oxydant (Lu et al., 2004). De la même manière, l’accumulation pathologique de dommages oxydatifs à l’ADN au cours de la maladie d’Alzheimer (Bradley-Whitman et al., 2014) pourrait altérer l’expression de certains gènes. Cette dérégulation participerait au processus neurodégénératif.

L’augmentation de dommages aux ARN observée dans la maladie d’Alzheimer et dans notre modèle peut également avoir des conséquences délétères importantes. Dans un individu sain, 2% de l’ARN neuronal présente des dommages de type 8-OHg tandis que des patients

Alzheimer peuvent présenter plus de 50% de leur ARN neuronal positif pour le dommage 8-OHg (Shan and Lin, 2006). Les dommages aux ARN, qu'ils soient ribosomiaux, de transfert ou messagers peuvent conduire à des erreurs de traduction, à une diminution de la traduction ou encore bloquer les ribosomes sur l'ARNm (pour revue Kong and Lin, 2010; Simms and Zaher, 2016). En 2003, une étude montre que l'oxydation des ARN n'est pas aléatoire au sein des cerveaux Alzheimer, il existe une vulnérabilité différente selon les ARNm. De plus, la transfection d'un ARNm rapporteur oxydé dans des lignées cellulaires induit une diminution de la quantité de protéines fonctionnelles. Les protéines synthétisées à partir de ces ARNm oxydés forment des agrégats probablement dûs, d'après les auteurs, à une mauvaise conformation, des erreurs de traduction ou une terminaison prématurée (Shan et al., 2003).

Ensemble, ces données suggèrent un potentiel « cercle vicieux » entre le stress oxydatif, les oligomères toxiques de Tau et les dommages aux acides nucléiques.

Le Dr Marie Violet, Lucie Delattre et moi-même avons contribué à part égale à ce travail. J'ai participé à la mise en œuvre des expériences *in vivo* de ce travail et plus particulièrement à la conception et la mise en œuvre de l'expérience visant à tester l'effet du bleu de méthylène sur l'oligomérisation de Tau et les dommages aux acides nucléiques.

***Etude 2 : Rôle du complexe Tau-DDX6 dans le
métabolisme des ARN***

Etude 2 : Rôle du complexe Tau-DDX6 dans le métabolisme des ARN.

A. Introduction

La protéine Tau est un acteur central de l'étiologie de nombreuses maladies neurodégénératives appelées tauopathies. Ces pathologies sont caractérisées par l'agrégation intra-neuronale de la protéine Tau. Tau est une protéine associée aux microtubules (MAP) dont la fonction la plus connue est la stabilisation et la polymérisation des microtubules. Or, son rôle ne se limite pas aux microtubules. En effet, de plus en plus de travaux émergent et dressent le portrait d'une protéine Tau aux multiples fonctions. Récemment, au sein de l'équipe, nous avons montré *in vivo*, dans des neurones de souris, un rôle de Tau dans le maintien de l'intégrité de l'ARN (Violet et al., 2014). En conséquence, nous nous sommes intéressés à la relation de Tau vis-à-vis des ARN. De nombreuses études ont d'ailleurs mis en évidence la capacité de Tau à interagir avec les ARN *in vitro* (Bryan et al., 1975; Kampers et al., 1996; Wang et al., 2006). De plus, au sein de cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y, Tau co-localise avec l'ARN (Wang et al., 2006b). L'analyse de l'interactome de Tau dans ces mêmes cellules révèle une robuste association de Tau avec des protéines impliquées dans le processing et la traduction des ARNm (Gunawardana et al., 2015). D'ailleurs, dès 1987, une co-localisation de Tau avec les ribosomes a été mise en évidence (Papasozomenos and Binder, 1987). L'ensemble de cette littérature suggère un rôle de Tau dans le métabolisme des ARN. Pourtant, à l'exception des travaux récents de Vanderweyde et collaborateurs, très peu d'études se sont intéressées précisément à une potentielle fonction physiologique de Tau dans le métabolisme des ARN. Dans le but d'éclaircir cette question, nous avons mis en place une stratégie de recherche de partenaires moléculaires de Tau par la méthode de purification d'affinité en tandem (méthode dite Tap-tag) dans des cellules SH-SY5Y. Parmi les partenaires identifiés, nous nous sommes intéressés à l'hélicase à ARN DDX6. Il s'agit d'une protéine impliquée non seulement dans la voie générale de répression de la traduction mais également dans la régulation de la traduction d'ARNm spécifiques par la voie des microARN (Chu and Rana, 2006; Coller and Parker, 2005). Notre hypothèse est que Tau est impliquée dans la régulation de la traduction à travers son interaction avec DDX6.

Notre objectif est, en premier lieu, de confirmer l'interaction de Tau avec DDX6. Dans un second temps, il s'agit de caractériser cette interaction. Enfin, le but final de ce travail est de déterminer la fonction de ce complexe Tau-DDX6.

B. Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Les cellules SH-SY5Y sont issues d'une lignée de neuroblastome humain (SK-N-SH) dérivée d'une tumeur extra-craniale. Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂, dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen) supplémenté en sérum de veau foetal (10%), en L-glutamine (2 mM) et en pénicilline/streptomycine (50 U/ml).

Transfection et mesure de l'activité luciférase

Les cellules SH-SY5Y sont transfectées le lendemain de leur ensemencement à l'aide d'un polymère cationique PEI (Polyéthylénimine, Exgen500, EUROMEDEX). Un mélange ADN/Exgen dans 100 µl de milieu DMEM dépourvu de sérum de veau foetal est réalisé à raison de 3,3 µl d'Exgen pour 400ng d'ADN pour un puits d'une surface de 2cm². Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 10 min puis placé sur les cellules.

Les plasmides utilisés pour le test fonctionnel relatif à l'activité de let-7a sont : le pcDNA3.1D-Firefly-Let-7a (Let-7a-Sensor), pcDNA3.1D-Firefly-Let-7a-mut (Mut-Let-7a-Sensor) (fournis par le Dr Sven Diederichs), le pcDNA3.1-Tau 46WT, le pcDNA3.1-Tau46P301S, le plasmide Tk-Renilla luciférase contrôle interne (Promega) ainsi qu'une quantité variable de plasmide vide.

Les plasmides utilisés pour le test fonctionnel relatif au tethering assay sont : pCI-neo-LbNHA p54, pRenillaLuciferaseBoxB, pRenillaLuciferaseΔBoxB, le plasmide pGL3-Firefly luciférase (fournis par le Dr Michel Kress et le Dr Dominique Weil), le pcDNA3.1-Tau 46WT ainsi qu'une quantité variable de plasmide vide.

Pour les transfections de siRNA, les cellules ont été transfectées par la méthode reverse utilisant l'agent de transfection DharmaFECT (GE Healthcare). Un mélange siRNA / DharmaFECT dans 100 µl de milieu DMEM dépourvu de sérum de veau foetal et réalisées à raison de 25nM de siRNA pour 0,8 µl de DharmaFECT par puits de 2cm² de surface. Les cellules sont ensuite transfectées 24h plus tard avec les différents systèmes rapporteurs en utilisant le PEI (méthode précisée ci-dessus).

Les cellules sont récupérées 48 à 72h après la transfection des systèmes rapporteurs. Les transfections de systèmes rapporteurs ont été analysées à l'aide du système « Dual-Luciferase Reporter Assay System » (Promega) selon les recommandations des fournisseurs.

Les plasmides ont été amplifiés dans les bactéries *Eschericia coli* (DH5alpha, Invitrogen) et purifiés à l'aide du Qiagen Plasmid midi kit (midi prep) selon les recommandations du fournisseur.

Mutagenèse dirigée

Les mutations des plasmides pGEX-2N, pGEX-PRD, pGEX-4R, pGEX-2N4R (don du Dr. Jean-Charles Lambert, U1167, Lille) ainsi que les mutations P301S et P301L du plasmide pcDNA3.1Tau46WT ont été effectuées à l'aide du kit « QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit » (Agilent Technologies). Pour cela, 50 ng de plasmide parental sont ajoutés à 5 µl de Reaction Buffer 10x, 125 ng d'amorce sens, 125 ng d'amorce anti-sens, 1 µl de mix dNTP et de l'eau ultrapure DNase/RNase free (qsp 50 µl) puis 2,5 U/µl d'ADN polymérase. Ce mélange est ensuite placé dans un thermocycleur (Applied Biosystems) selon les conditions suivantes : dénaturation 30 sec à 95°C suivie de 16 cycles (dénaturation 30 sec à 95°C, hybridation 1 min à 55°C et élongation 5 min à 68°C). Afin de digérer le plasmide parental et ne conserver que le plasmide fils muté, 10 U/µl d'enzyme de restriction Dpn I est ajouté dans la solution d'amplification pendant 1h à 37°C. Le plasmide muté est ensuite amplifié par transformation dans les bactéries XL1-Blue selon le protocole du fournisseur. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu LB-agar (Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 10mM, NaOH 2mM, Agar 2%) supplémenté en ampicilline (50µg/ml) puis elles sont incubées dans une étuve à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, quelques clones isolés sont remis en culture dans 5 ml de milieu LB supplémenté en ampicilline (50µg/ml). Les plasmides sont extraits à l'aide du kit « NucleoSpin Plasmid - plasmid Miniprep kit » (Macherey-Nagel). La présence des mutations est ensuite vérifiée par séquençage. Les séquençages sont effectués par une société externe (GATC Biotech).

GST pulldown

Des bactéries *Eschericia coli* (Bl21, Invitrogen) sont transformées par des vecteurs pGEX (Glutathion S-transferase Gene Fusion System) codant les mutants de délétions de la

protéine Tau fusionnées à la GST (don du Dr. Jean-Charles Lambert, U1167, Lille), les différents mutants d'interactions ainsi que pGEXp54. Quelques clones sont repris dans 5 ml de milieu LB (Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 10 mM, NaOH 2 mM) contenant de l'ampicilline (50 µg/ml). Ces précultures sont ensuite mises sous agitation 120 rpm à 37°C toute la nuit. Le lendemain, les précultures sont alors diluées dans 200 ml de LB/ampicilline (50 µg/ml) et replacées sous agitation (120 rpm) à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO600 comprise entre 0,3 et 0,6. L'induction de l'expression de la protéine de fusion est effectuée par l'ajout d'IPTG (isopropylβ-D-thiogalactoside, Roche) à la concentration de 1 mM final. La croissance est poursuivie pendant 4 h, puis les bactéries sont centrifugées (10 000 rpm, 4°C, 15 min) afin de récupérer les culots bactériens. Les cellules sont ensuite lysées dans du PBS 2X, Triton X-100 0,1% et soniquées.

Les plasmides codant la protéine DDX6 (pcDNA3.1-DDX6) ou Tau (pcDNA3.1-Tau46WT) sont transcrits et traduits *in vitro* à l'aide du kit « TNT T7 quick coupled transcription/Translation System » (Promega) selon les recommandations du fournisseur. La quantité désirée de protéines de fusion est ensuite chargée sur la résine Glutathion sepharose 4B (Sigma) équilibrée au préalable dans du tampon PBS 2X, Triton X-100 0,1%. Le mélange est incubé 1 h à 37°C, lavé 2 fois par du tampon PBS 2X, Triton X-100 0,1% et 2 fois par du Wash Buffer (Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, NP40 0,01%, DTT 1 mM). Le lysat de réticulocyte contenant la protéine d'intérêt traduite *in vitro* est alors chargé dans 500 µl de Wash Buffer suivi d'une incubation de 1 h 30 min à 4°C sous agitation. La résine est ensuite lavée 3 fois à l'aide du Wash Buffer puis les protéines sont éluées dans du tampon de dépôt composé de LDS 4X (Lithium Dodécyl Sulfate, Invitrogen) et de DTT 500 mM (Dithiothreitol, Invitrogen).

Proximity Ligation Assay

Les cellules SY-SH5Y sont ensemencées dans des chambres de culture Lab-tek (Dutscher) et fixées par incubation des cellules dans du paraformaldéhyde 4% pendant 30 min. La lame est ensuite lavée 2 fois dans du PBS puis les cellules sont perméabilisées par une solution de PBS/ 0,2% Triton. La lame est ensuite lavée 2 fois au PBS puis incubée 1 h dans une solution saturante PBS/sérum de cheval (1/100ème). Les anticorps primaires sont incubés dans du PBS/ 0,2% Triton toute la nuit à 4°C. Après 2 lavages de 5 min dans du Wash Buffer A (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%), les anticorps secondaires couplés à un

oligonucléotide (sonde PLA) dilués au 1/5e sont ensuite incubés avec la lame à 37°C pendant 1 h. Après 2 lavages de 5 min dans du Wash Buffer A, la lame est ensuite incubée 30 min à 37°C dans la solution de ligation préparée selon les recommandations du fournisseur, suivi par 2 lavages de 2 min avec du Wash Buffer A. Par la suite, la lame est incubée dans la solution d'amplification contenant la polymérase pendant 100 min à 37°C. Il est effectué ensuite 2 lavages de 10 min avec du Wash Buffer B 1X (Tris 0,2 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5). Un dernier lavage est effectué avec du Wash Buffer 0,01X. La lame est ensuite montée avec une solution de montage contenant du DAPI (4'6'-diamidino-2-phénylindole, Duolink, SIGMA), puis analysée au microscope confocal.

Immunocytochimie

Les cellules SH-SY5Y sont fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à température ambiante. Puis elles sont perméabilisées dans du PBS-Triton X-100 0.2% pendant 10 minutes. Après une saturation de 30 minutes dans de la Serum Albumine Bovine 2%, les anticorps Tau-5 (AHB0042 Thermofisher) et DDX6 (A300-461 Bethyl) sont incubés 24h à 4°C. Les anticorps sont révélés avec des anticorps goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgG couplés à Alexa Fluor® 488 ou 568 (Life). Le DAPI est présent dans le milieu de montage « Vectashield mounting medium for fluorescence » (Vector). Les lames sont ensuite analysées au microscope confocal.

Co-purification TAP-tag

Les co-précipitations ont été effectuées à partir de la lignée cellulaire SH-SY5Y sur-exprimant ou non différentes isoformes 46N et 37N de Tau fusionnée à un tag composé des séquences protéiques « Streptavidin Binding Protein & Calmodulin Binding Protein ». Après avoir trypsinisé les cellules, ces dernières sont ensuite centrifugées 5 minutes à 4°C à 1100g et lavées 2 fois au PBS. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans du tampon Hepes 10 mM (pH 7,9), KCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM et anti-protéase (cOmplete, Mini, Roche). Après une incubation de 15 min dans la glace, du Triton X-100 (0,1%) est ajouté à l'extrait cellulaire. L'extrait est ensuite centrifugé 5 minutes à 4°C à 6000g. Le surnageant est collecté et correspond à la fraction cytosolique. Le culot contenant les la fraction nucléaire est lavé avec le tampon précédent sans Triton X-100 puis le culot est resuspendu dans le tampon 5mM Hepes

(pH7,9), 26% glycerol, 0,5mM EDTA, 1mM DTT. Après ajout de KCl 350mM final, les échantillons sont incubés à 4°C sous agitation. Les échantillons sont ensuite centrifugés 30 minutes à 4°C à 13000g. Le surnageant est collecté et correspond à l'extrait nucléaire.

Concernant le lysat, après avoir trypsinisé les cellules, ces dernières sont ensuite centrifugées 5 minutes à 4°C à 1100g et lavées 2 fois au PBS. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans du tampon de lyse (Tris 25 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM et antiprotéase (cOmplete, Mini, Roche). Après une incubation de 15 min dans la glace, l'extrait cellulaire est obtenu après ajout de 0,1% Triton X100 et 340 mM de NaCl final, suivi d'une incubation de 1 h sous agitation à 4°C. Le lysat est ensuite récupéré après une centrifugation de 15 min à 4°C à 13000g.

Pour la co-précipitation, le lysat cellulaire est dilué au 1/3 à l'aide d'un tampon de dilution composé de Tris (25 mM), EDTA (0,1 mM) et NP40 (0,01%) puis incubé toute la nuit à 4°C sous agitation avec la résine (Dynabeads M-270 Streptavidin, Life Technologies) équilibrée au préalable avec un tampon composé de Tris (50 mM), NaCl (100 mM), EDTA (0,1 mM), NP40 (0,05%). Le lendemain, la résine est lavée 3 fois avec le tampon d'équilibration. Les protéines sont ensuite éluées par du tampon de dépôt composé de LDS 4X (Lithium Dodécyl Sulfate, Invitrogen) et de DTT 500 mM (Dithiothreitol, Invitrogen).

Analyse biochimique

Electrophorèse monodimensionnelle et Western Blot

Les échantillons sont dilués dans du tampon de dépôt composé de LDS 4X (Lithium Dodécyl Sulfate, Invitrogen) et de DTT 500 mM (Dithiothreitol, Invitrogen). Puis, les protéines sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante, appelée SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate, PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) afin de les séparer en fonction de leurs masses moléculaires. Pour cela, les échantillons sont déposés dans les puits de gel réticulé à 4-12% (Nupage, Invitrogen). La migration est effectuée sous une tension constante à 200V pendant 1 h dans du tampon MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen).

Après l'électrophorèse monodimensionnelle, les protéines contenues dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose d'une porosité de 0,45 µm (Hybond, GE HealthCare) sous une tension de 30V pendant 90 min. Une coloration réversible des protéines au Rouge Ponceau (Acide trichloroacétique 3%, Rouge Ponceau 0,2%) est ensuite effectuée

afin de vérifier l'efficacité du transfert. Après un lavage au TNT (Tris-HCl 100 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%), les sites non spécifiques sont saturés par incubation dans une solution de TNT supplémentée de lait à 5% pendant 45 min à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps d'intérêt dilué selon les recommandations du fournisseur dans du TNT / lait 5% ou TNT / BSA 5%, une nuit sous agitation à 4°C (Tableau ci-dessous).

Anticorps	Dilution	Anticorps secondaires
DDX6 (A300-461A) Bethyl	1/5000 ^{ème} TNT 5% lait	1/5000 ^{ème} lapin
Tau Cter	1/10000 ^{ème} TNT 5% lait	1/5000 ^{ème} lapin
β-actine (sigma)	1/10000 ^{ème} TNT 5% lait	1/50000 ^{ème} souris
c-myc (D84C12) Rabbit mAb #5605	1/1000 ^{ème} TNT 5% BSA	1/5000 ^{ème} lapin

Conditions d'utilisation des anticorps en immunoempreinte.

Les membranes sont ensuite lavées au TNT (3x10 min) puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Vector laboratories), dilué dans du TNT, pendant 60 min à température ambiante et sous agitation. Il est effectué ensuite une deuxième série de lavage au TNT (3x10 min). Le complexe antigène/anticorps est révélé par l'utilisation de l'ECL (GE HealthCare). Le signal émis est capté par acquisition au LAS4000 et les données sont analysées par le logiciel ImageJ (Graph Las Software Inc, USA).

Biologie moléculaire

Extraction des ARNm totaux

Les ARNm sont extraits à l'aide du kit « Nucleospin RNA » (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. La concentration des ARN a été déterminée par dosage spectrophotométrique.

Transcription inverse

La rétro-transcription est réalisée à partir de 500ng d'ARN total à l'aide du kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (ThermoFisher) selon les recommandations du fabricant.

Q-PCR

Les Q-PCR ont été réalisées par la méthode Taqman selon les recommandations du fabricant. Les primers utilisés sont : MYC (Hs00153408_m1, hCG15917) et le gène de référence GusB (Hs00939627_m1, hCG18478) (life). Les PCR quantitatives sont réalisées à l'aide du thermocycleur StepOnePlus (Applied). L'amplification est effectuée en duplicat et l'expression relative des gènes cibles est déterminée par la méthode des $\Delta\Delta CT$.

Statistiques

Les analyses issues des différentes expériences sont exprimées sous forme d'une moyenne et de l'erreur-type de la moyenne. Pour ce travail, nous avons utilisé deux tests : test de Wilcoxon-Mann-Whitney et le test de Mann-Whitney. Les statistiques ont été réalisées sur le logiciel prism (graphpad software). * $P < 0,05$.

C. Résultats

I. Tau interagit avec DDX6.

Dans un premier temps nous avons testé l'interaction de DDX6 avec différentes isoformes de Tau. Il s'agit de l'isoforme Tau 46N (1N4R, 2+3-10+) à 4 domaines de liaisons aux microtubules (SH-SY5Y 46N) et une isoforme Tau 37N (1N3R, 2+3-10-) à 3 domaines de liaisons aux microtubules (SH-SY5Y 37N). Puis, nous avons décidé de focaliser notre travail sur l'isoforme de Tau 46N. Dans une lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y, sur-exprimant ou non différentes isoformes de la protéine Tau taguée, différentes approches sont utilisées : TAP-tag, immunofluorescence (co-localisation Tau/DDX6 visualisée par co-

marquage et stratégie Proximity Ligation Assay). Parallèlement, par une approche *in vitro* GST-pulldown, nous avons validé l'interaction directe entre Tau et DDX6.

Tap-Tag

Nous disposons de deux lignées cellulaires SH-SY5Y exprimant chacune l'isoforme Tau 46N et l'isoforme Tau 37N couplée à un tag constitué d'un Streptavidin Binding Peptide associé à un Calmodulin Binding Peptide. Une lignée SH-SY5Y n'exprimant pas de Tau taguée (SH-SY5Y) constitue le contrôle. A partir de ces cellules, nous avons réalisé un fractionnement noyau/cytosol ou obtenu du lysat cellulaire. Ces fractions protéiques obtenues sont ensuite incubées avec des billes couplées à la streptavidine. Après des étapes de lavages, la Tau taguée et ses partenaires protéiques sont purifiés par affinité biotine-streptavidine. La présence de DDX6 parmi les partenaires co-purifiés avec Tau est alors déterminée par immuno-empreinte sur ces fractions purifiées (Fig. 1).

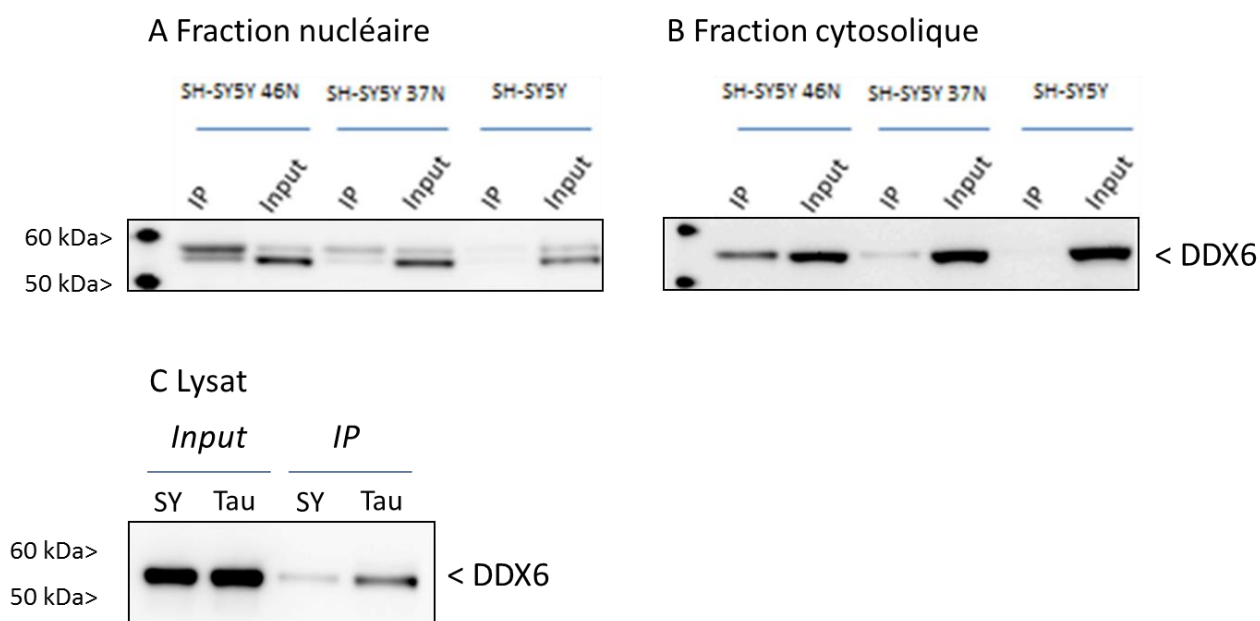


Figure 1 – Mise en évidence de l'interaction Tau/DDX6 par TAP tag dans la fraction nucléaire (A), la fraction cytosolique(B) et le lysat (C) de lignée SH-SY5Y sur-exprimant ou non les isoformes de Tau 37N et 46N. Les immuno-empreintes sont réalisées à partir de fractions obtenues après une purification TAP tag de Tau taguée et révélée à l'aide d'un anticorps anti-DDX6. La fraction IP correspond à la fraction purifiée, l'input correspond à la fraction protéique nucléaire, cytosolique ou le lysat total. (N = 3 expériences indépendantes)

Tau et DDX6 sont co-purifiées à la fois dans la fraction nucléaire et cytosolique, ainsi que dans le lysat cellulaire ce qui confirme l'hypothèse d'une interaction entre Tau et DDX6 dans notre système (Fig. 1). Tandis qu'une seule bande est observée pour DDX6 dans la fraction cytosolique, un signal constitué de deux bandes apparaît dans la fraction nucléaire.

GST-pull down

La méthode de GST-pulldown est une technique qui consiste à tester *in vitro* l'interaction directe entre deux protéines. Des bactéries *E. Coli* sont transformées par des plasmides contenant l'ADNc codant la protéine Tau 40 (2N4R, 2+3+10+) ou la protéine DDX6 couplées à un tag glutathione S-transferase (GST) ou le tag seul. Ainsi, ces bactéries produiront les protéines d'intérêt qui seront extraites et purifiées. Parallèlement, la protéine Tau ou DDX6 est produite *in vitro* à partir d'un plasmide codant Tau ou DDX6 par transcription et traduction dans un lysat de réticulocyte (TnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System de promega). Les billes couplées au glutathion sont incubées avec la protéine de fusion GST-Tau (Fig. 2A) ou la protéine GST-DDX6 (Fig. 2B) ou encore la GST seule. La protéine de fusion se lie à la bille par affinité GST-glutathion. On incube alors ces billes avec le lysat de réticulocyte contenant des protéines DDX6 (Fig. 2A) ou Tau (Fig. 2B). Après des lavages successifs, les complexes sont élués. Les présences de DDX6 et de Tau sont alors déterminées par immuno-empreinte avec un anticorps anti-DDX6 (Fig. 2A) ou anti-Tau (Fig. 2B).

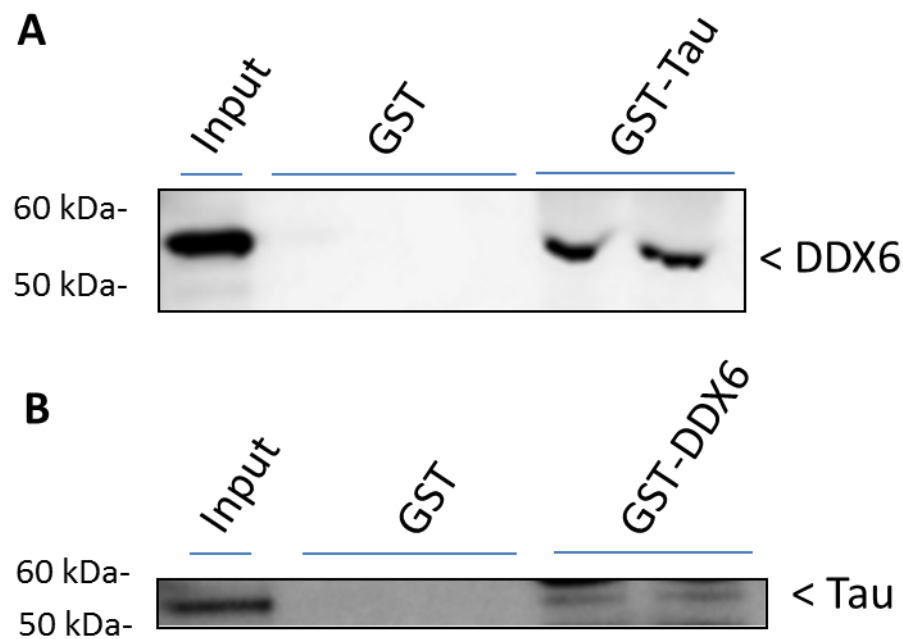


Figure 2 – Co-purification du complexe Tau/DDX6 formé *in vitro* par GST-pulldown. Les fractions purifiées sont analysées en immuno-empreinte et révélées par un anticorps anti-DDX6 (A). La réaction inverse est révélée par un anticorps anti-Tau (B). L'input correspond à 20% de l'extrait de DDX6 (A) et de Tau46 (B) synthétisé *in vitro* et ajouté à chaque mélange réactionnel. La fraction GST correspond au tag seul. La fraction GST-Tau correspond à la protéine de fusion GST - isoforme Tau 40 (2+3+10+) à 4 domaines de liaisons aux microtubules, la fraction GST-DDX6 correspond à la protéine de fusion GST-DDX6. (N = 3 expériences indépendantes)

Les résultats de GST-pulldown montrent que Tau et DDX6 interagissent *in vitro* de façon directe (Fig. 2).

Immunocytochimie

Afin d'observer cette interaction, nous avons effectué un co-marquage Tau et DDX6 dans des cellules SH-SY5Y (Fig. 3).

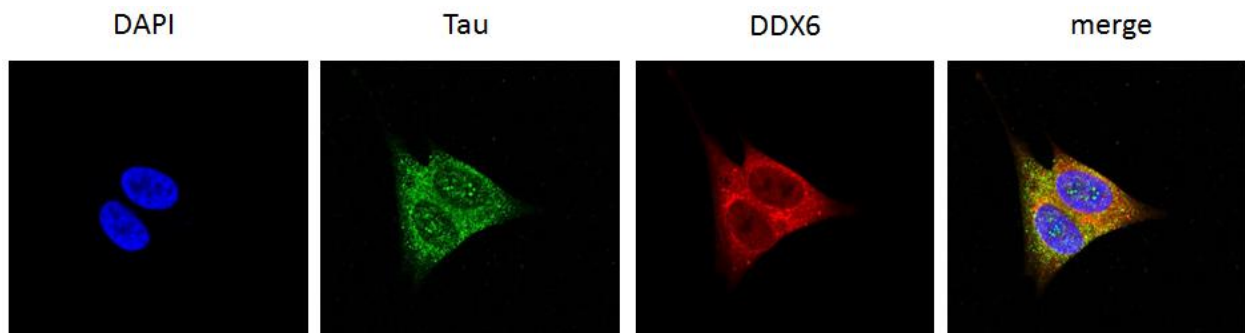


Figure 3 – Co-marquage Tau et DDX6 dans des cellules SH-SY5Y. Immunocytochimie réalisée à l’aide d’anticorps dirigés contre Tau et DDX6 dans des cellules SH-SY5Y. Images obtenues par microscopie confocale. (N = 2 expériences indépendantes)

Nous observons une co-localisation de Tau et DDX6 principalement dans le cytoplasme (Fig. 3).

Proximity Ligation Assay

Dans le but de visualiser cette co-localisation, nous avons utilisé la technologie Proximity Ligation Assay. Ce système permet de détecter des interactions protéiques et de les observer par fluorescence *in cellulo*. Brièvement, les cellules fixées sont incubées avec deux anticorps primaires dirigés contre deux protéines d’intérêt produits chez deux espèces différentes. Des anticorps secondaires spécifiques d’une espèce et couplés à un oligonucléotide simple brin sont ensuite ajoutés. Lorsque ces oligonucléotides sont proches (distance inférieure à 40nm), les oligonucléotides peuvent interagir et former un ADN circulaire après la ligation à deux oligonucléotides complémentaires. Puis, cet ADN circulaire est amplifié sous l’action d’une polymérase. Enfin, des oligonucléotides complémentaires couplés à un fluorochrome vont interagir avec l’ADN synthétisé et permettre de produire et d’amplifier un signal fluorescent. Cette technique permet ainsi de visualiser un signal ponctiforme correspondant à une étroite proximité entre deux protéines d’intérêt par immunocytochimie.

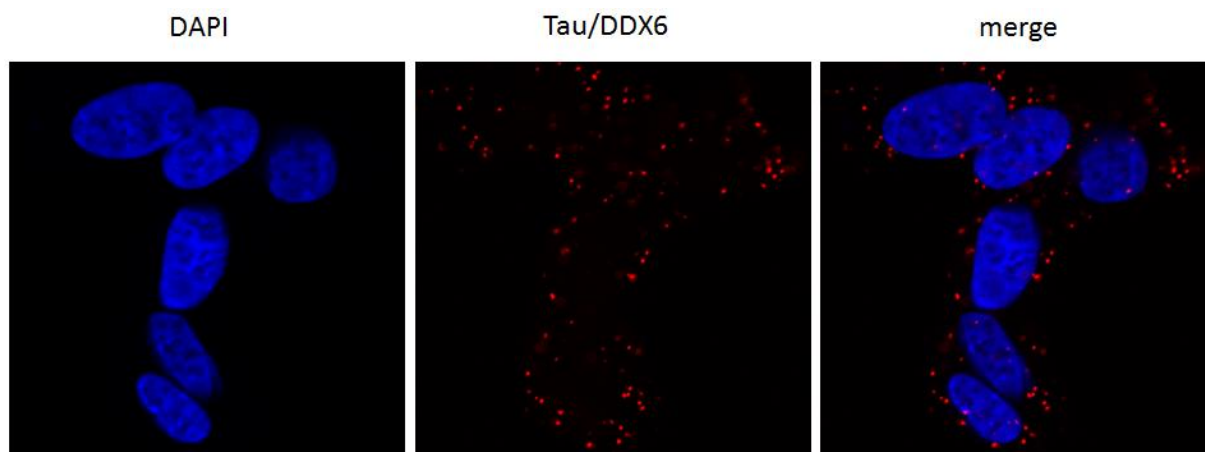


Figure 4 – Proximity Ligation Assay Tau/DDX6 dans des cellules SH-SY5Y. Réalisé à l'aide d'anticorps primaires dirigés contre Tau et DDX6 dans des cellules SH-SY5Y. Images obtenues par microscopie confocale. (N = 2 expériences indépendantes)

Cette technique met en évidence *in cellulo* un signal ponctiforme principalement localisé dans le cytoplasme correspondant à une co-localisation étroite entre Tau et DDX6 (Fig. 4).

Ces résultats, obtenus grâce à différents outils convergent vers une mise en évidence de l'existence d'une interaction de Tau avec DDX6.

II. Caractérisation de l'interaction de Tau avec DDX6.

Notre but est de déterminer les acides aminés de Tau impliqués dans l'interaction avec DDX6 afin de disposer de mutants Tau permettant d'abolir ou de minorer l'interaction de Tau avec DDX6. Cet outil nous permettra de tester l'implication de ce complexe dans différents processus cellulaires. Pour cela, nous disposons de fragments de la protéine Tau correspondant aux principaux domaines de la protéine couplés à un tag GST. Dans un premier temps, nous avons déterminé par GST pulldown quel domaine de Tau co-purifie avec DDX6 et par voie de conséquence est impliqué dans l'interaction avec DDX6. Dans un second temps, nous avons généré différents fragments des domaines impliqués dans l'interaction fusionnés à un tag GST. Par GST-pulldown, nous avons ainsi précisé quelle partie du domaine est impliquée dans l'interaction. Enfin, nous avons réalisé des mutations ponctuelles sur la séquence de Tau afin de déterminer les acides aminés essentiels à l'interaction.

Par GST Pull Down, nous avons mis en évidence les régions de Tau impliquées dans l'interaction avec DDX6.

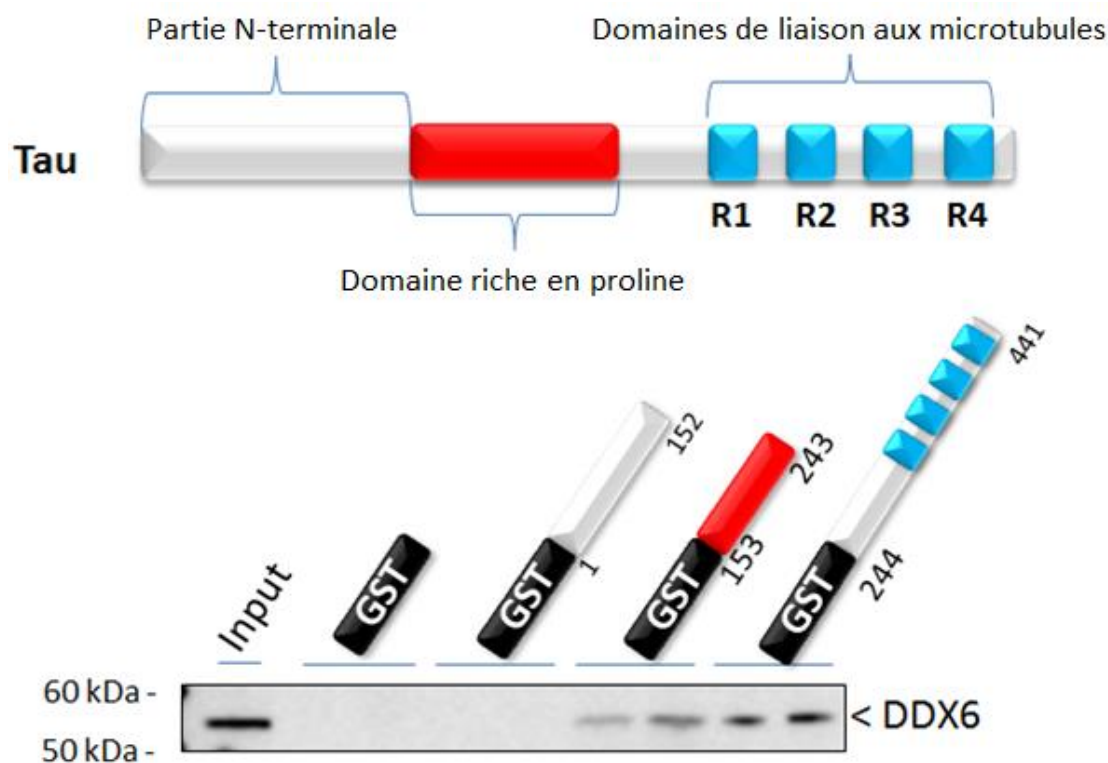


Figure 5 – Analyse des domaines de Tau impliqués dans son interaction avec DDX6. GST Pull Down utilisant des bactéries produisant des formes tronquées de la protéine Tau. Les acides aminés 1 à 152 correspondent à la partie N-terminale contenant les exons alternatifs 2 et 3, les acides aminés 153 à 243 correspondent au domaine riche en proline et les acides aminés 244 à 441 correspondent aux 4 domaines de liaisons aux microtubules. La présence de DDX6 dans la fraction purifiée est vérifiée par une immuno-empreinte, révélée par un anticorps anti-DDX6. (N = 3 expériences indépendantes)

Les régions de Tau impliquées dans l'interaction avec DDX6 sont le domaine riche en proline ainsi que les domaines de liaisons aux microtubules (Fig. 5). Afin de préciser les séquences d'acides aminés minimum essentielles impliquées dans l'interaction avec DDX6, nous avons généré différents mutants de délétion. Chaque domaine est fragmenté en séquences d'une vingtaine d'acides aminés fusionnées à un tag GST. La même stratégie GST-pulldown a ainsi pu être menée.

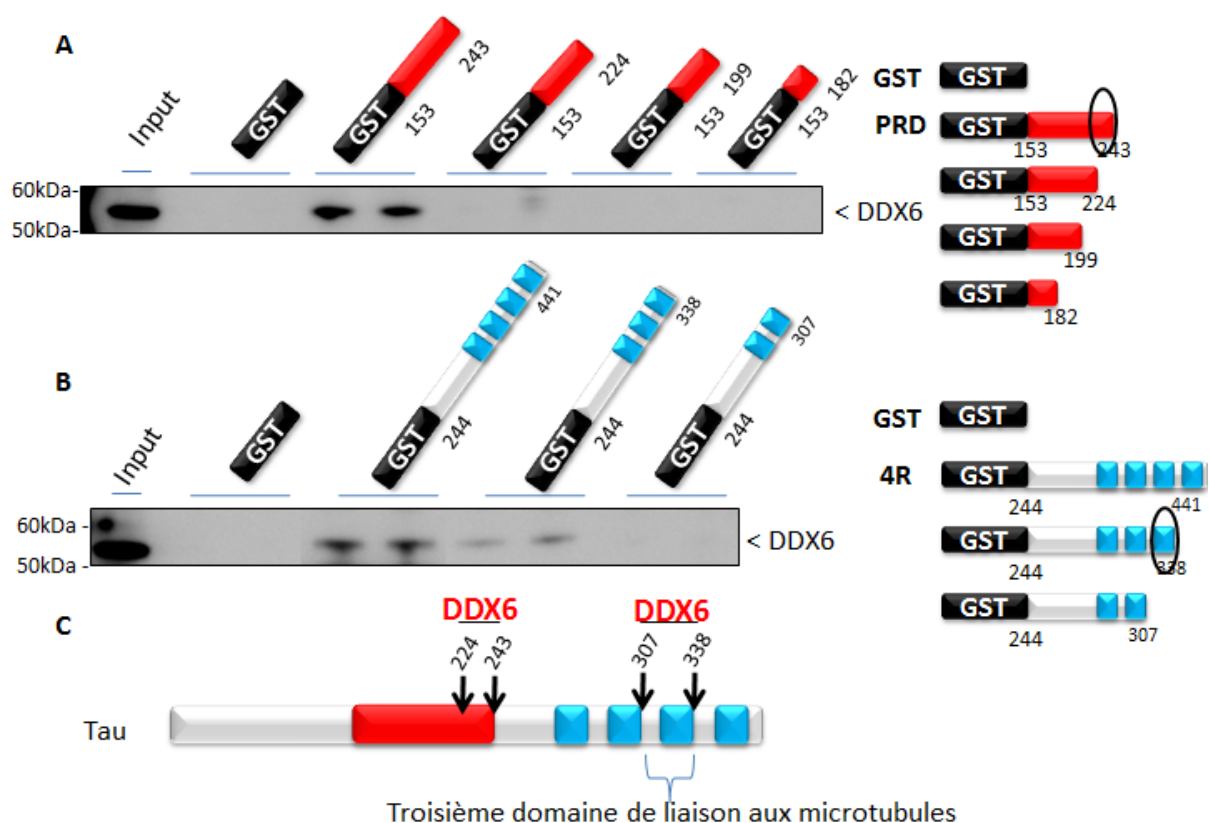


Figure 6 – Analyse des domaines de Tau impliqués dans son interaction avec DDX6. (A) GST Pull Down utilisant des bactéries produisant le domaine riche en proline ainsi que différents fragments de ce domaine raccourci en C-terminal. (B) GST Pull Down utilisant des bactéries produisant les domaines de liaisons aux microtubules ainsi que différents fragments de ce domaine raccourci en C-terminal. La présence de DDX6 dans la fraction purifiée est vérifiée par une immuno-empreinte, révélée par un anticorps anti-DDX6. (N = 3 expériences indépendantes)

Nous avons mis en évidence l'implication de la partie C-terminale du domaine riche en proline (Fig. 6A) ainsi que le troisième domaine de liaison aux microtubules (Fig. 6B) dans l'interaction avec DDX6 (Fig. 6C)

Par alignement de séquence, nous avons constaté que ces deux régions sont très conservées d'une espèce à l'autre. En vue d'identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction, nous avons substitué certains acides aminés aux propriétés physico-chimiques particulières par des glycines, acide aminé le plus simple. Enfin, nous avons mis en œuvre la même stratégie GST-pulldown afin de déterminer l'effet de ces mutations sur l'interaction entre Tau et DDX6.

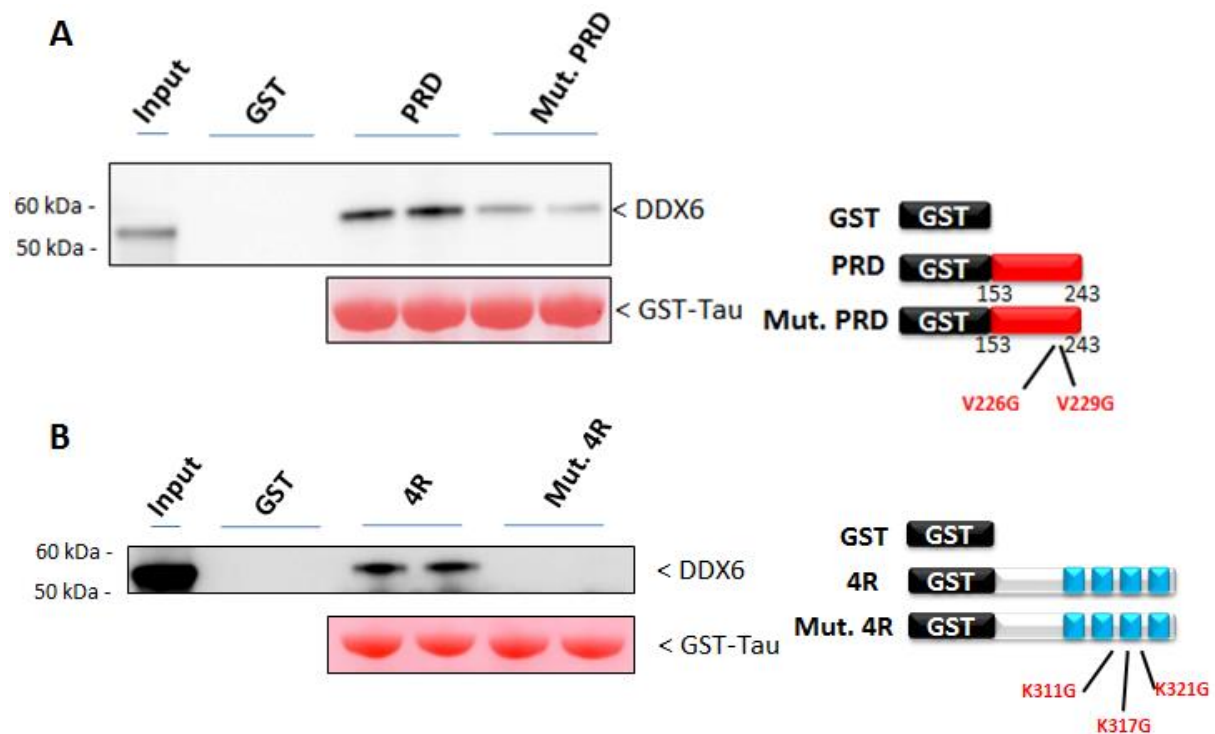


Figure 7 – Analyse des acides aminés de Tau impliqués dans son interaction avec DDX6. (A) GST Pull Down utilisant des bactéries produisant le domaine riche en proline, PRD sauvage ou avec 2 mutations faux-sens V226G et V229G, Mut. PRD. (B) GST Pull Down utilisant des bactéries produisant les domaines de liaisons aux microtubules sauvages, 4R, ou 3 mutations faux-sens K311G, K317G et K321G, Mut. 4R. La présence de DDX6 dans la fraction purifiée est vérifiée par une immuno-empreinte, révélée par un anticorps anti-DDX6. Une coloration au rouge ponceau est utilisée comme témoin de charge. (N = 3 expériences indépendantes)

Comparativement aux fractions co-purifiées à partir de fragments sauvages de Tau couplés à la GST, nous observons une diminution de l'interaction de DDX6 avec les formes mutées Mut. PRD (Fig. 7A) et une abolition de son interaction avec Mut. 4R (Fig. 7B). Les acides aminés valine 226 et/ou valine 229 sont impliqués dans l'interaction entre le domaine riche en proline et DDX6. Les acides aminés lysine 311 et/ou lysine 317 et/ou lysine 321 sont impliqués dans l'interaction entre les domaines de liaisons aux microtubules et DDX6. Nous avons généré une protéine Tau 2N4R arborant l'ensemble de ces mutations afin de confirmer l'effet de ces mutations sur la protéine Tau pleine taille.

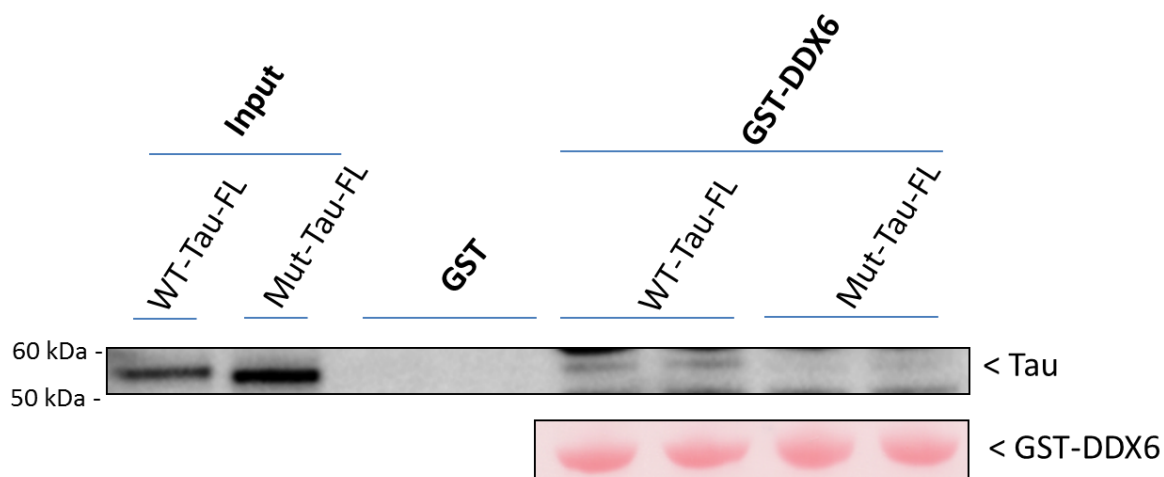


Figure 8 – Effet des mutations V226G, V229G, K311G, K317G, K321G sur l’interaction de la protéine Tau pleine taille avec DDX6. GST Pull Down utilisant des bactéries produisant la protéine de fusion DDX6 couplée à la GST. La protéine Tau sauvage ou arborant les mutations V226G, V229G, K311G, K317G et K321G pleine taille est synthétisée *in vitro* dans un lysat de réticulocytes. La présence de Tau dans la fraction purifiée est vérifiée par un western blot, révélé par un anticorps anti-Tau, Tau Cter. Une coloration au rouge poncau est utilisée comme témoin de charge. (N = 3 expériences indépendantes)

Par GST-pulldown, nous confirmons une diminution de l’interaction de DDX6 avec la Tau pleine taille mutée au niveau des sites V226G, V229G, K311G, K317G et K321G (Fig. 8)

III. Les mutations pathologiques P301S et P301L altèrent la liaison de Tau avec DDX6.

Ainsi l’interaction de Tau avec DDX6 est localisée à proximité de la proline 301. Des mutations pathologiques impliquées dans des démences frontotemporales avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 sont localisées au niveau de cet acide aminé. Il s’agit des mutations P301S et P301L. P301L est la mutation pathologique la plus fréquente dans les FTDP-17 et toutes deux sont parmi les mieux décrites dans la littérature. Nous avons donc testé l’effet de ces mutations pathologiques sur l’interaction Tau-DDX6.

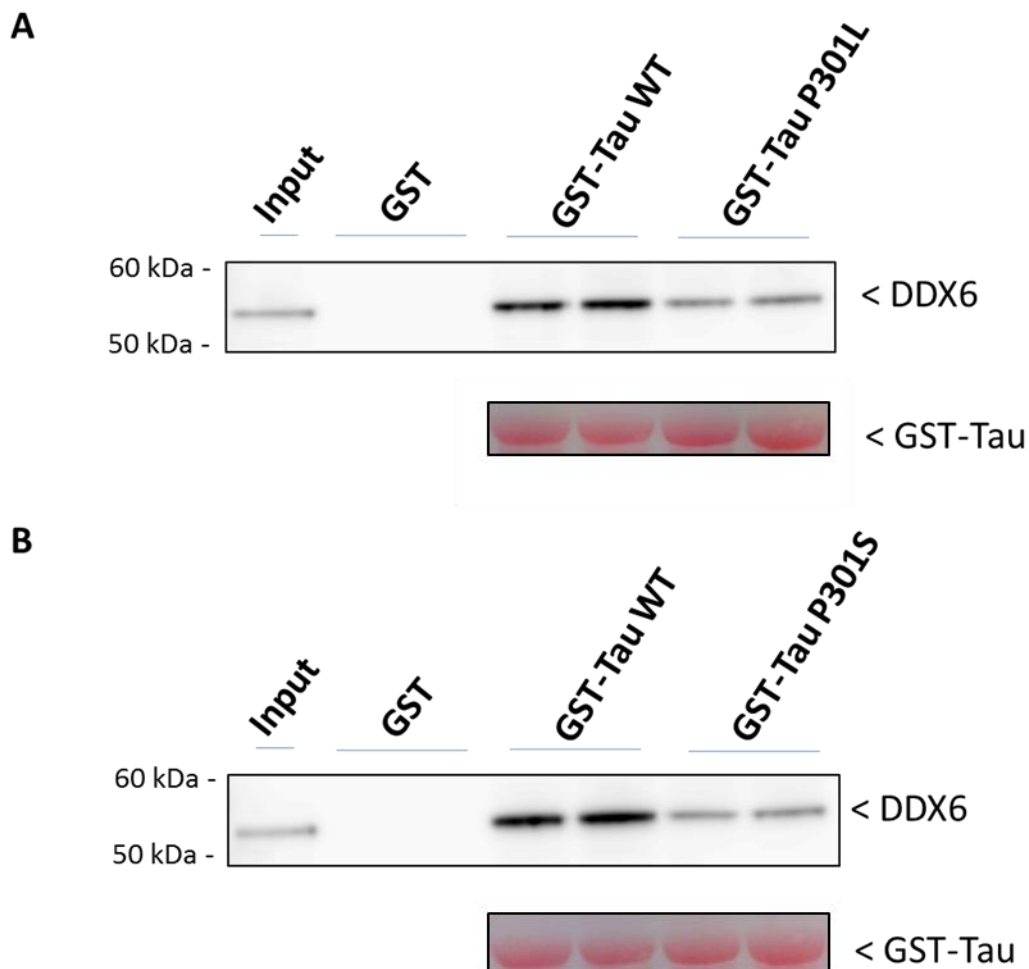


Figure 9 - Effet des mutations P301L et P301S sur l'interaction de la protéine Tau avec DDX6. GST Pull Down utilisant des bactéries produisant la protéine de fusion Tau couplée à la GST sauvage, P301L (A) ou P301S (B). La protéine DDX6 est synthétisée *in vitro* dans un lysat de réticulocytes. La présence de DDX6 dans la fraction purifiée est vérifiée par un western blot, révélé par un anticorps anti-DDX6. Une coloration au rouge poncau est utilisée comme témoin de charge. (N = 3 expériences indépendantes)

Comparativement à la fraction co-purifiée à partir de la protéine Tau sauvage couplée à la GST, nous observons une diminution de l'interaction de DDX6 avec les formes mutées Tau P301L et P301S (Fig. 9A,B). Nous avons ainsi, à notre disposition, des mutants de Tau dont l'interaction avec DDX6 est affaiblie. Ils constituent des outils de choix dans la recherche d'une réalité fonctionnelle au complexe Tau-DDX6. Le prochain objectif est de déterminer la fonction du complexe Tau-DDX6 par deux tests fonctionnels différents.

IV. Tau n'est pas impliquée dans le comportement répresseur général de la traduction de DDX6 au sein de notre système.

DDX6 est un répresseur de la traduction. C'est pourquoi notre objectif est de tester si Tau a un impact dans la répression de la traduction assurée par DDX6. Parmi les écueils qui peuvent interférer dans l'étude de protéines interagissant avec l'ARN, figurent les difficultés liées à l'identification de l'ARN cible naturel de la protéine d'intérêt ainsi que les événements cellulaires qui peuvent altérer son interaction avec l'ARN. Nous disposons d'un outil expérimental couramment utilisé dans l'étude des fonctions de protéines impliquées dans le métabolisme des ARN : le tethering assay. Le tethering assay permet de s'affranchir de la contrainte de la liaison à l'ARN pour n'étudier que l'effet de cette protéine sur un ARN particulier. Pour cela, la protéine de liaison à l'ARN est fusionnée à un « tether », en l'occurrence ici, le peptide Lambda-N (LbN). Ce dernier se lie avec une forte affinité à une structure secondaire ARN en épingle à cheveux : BoxB. Cette structure est localisée en 3'UTR d'un rapporteur luciférase. En parallèle, un rapporteur similaire dépourvu de sites de liaisons BoxB est utilisé en contrôle. Dans notre système, nous disposons d'un plasmide codant la protéine DDX6 fusionnée avec un tag HA et le peptide Lambda-N (LbNHA-DDX6). Il est co-transfecté dans des cellules SH-SY5Y avec un rapporteur renilla disposant ou non de sites de liaisons BoxB. Un rapporteur luciférase firefly est utilisé en contrôle interne. L'activité luciférase témoigne de l'effet de LbNHA-DDX6 sur la traduction du rapporteur (Fig. 10).

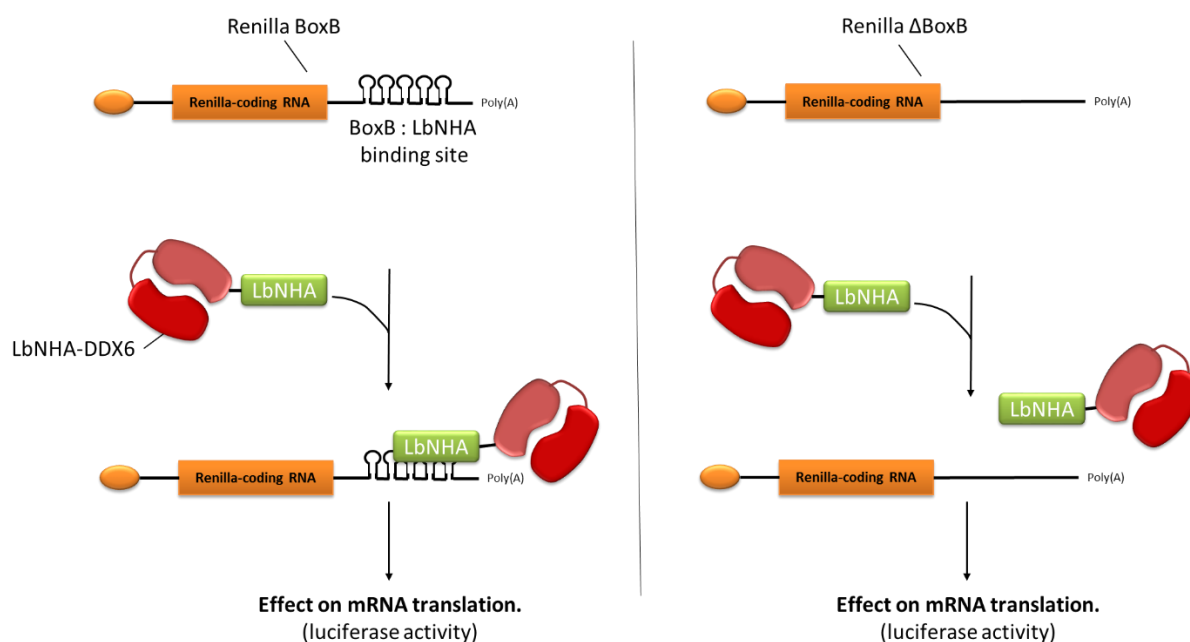


Figure 10 – Principe de fonctionnement du système tethering. DDX6 est fusionné au tether LbN, d’une longueur de 22 acides aminés. Cette séquence se lie avec une forte affinité et spécificité à la structure secondaire BoxB mesurant 19 acides aminés localisées en 3’UTR du rapporteur luciférase BoxB. La protéine de fusion et le rapporteur luciférase Renilla BoxB ou Renilla ΔBoxB sont co-exprimés dans des cellules SH-SY5Y. L’effet de cette liaison artificielle sur la traduction de l’ARNm cible est mesurée par activité luciférase.

Afin de tester l’impact de Tau sur l’effet represser de DDX6 vis-à-vis de la traduction, une co-transfection de quantité croissante du plasmide codant la protéine Tau accompagne ce tethering assay. Il s’agit de l’isoforme Tau46 (2+3-10+), l’isoforme de Tau la plus exprimée dans le cerveau humain adulte.

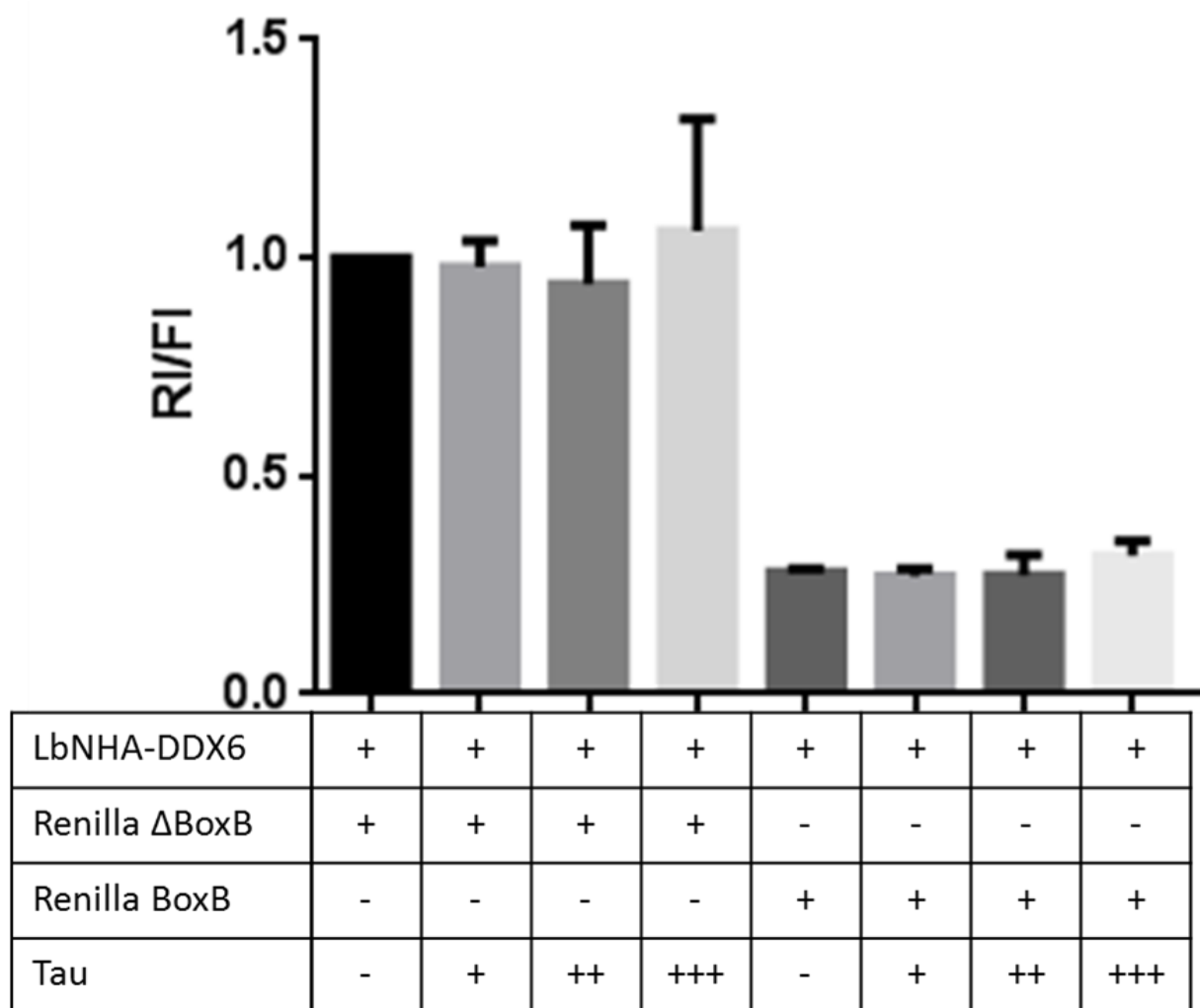


Figure 11 – Tau ne module pas l’effet répresseur de la traduction de DDX6 dans notre système expérimental de tethering assay. Diagramme montrant l’effet de Tau sur la répression traductionnelle générale induite par DDX6 en condition contrôle. Les cellules SH-SY5Y sont co-transfectées avec les plasmides codant LbNHA-DDX6, Renilla Δ BoxB ou Renilla BoxB et un contrôle interne firefly luciférase. Des quantités croissantes de plasmides codant la protéine Tau46 (2+3-10+) sont co-transfectées. Les valeurs d’activité Renilla sont normalisées sur l’activité firefly luciférase du contrôle interne. (mean $\pm$ SEM, $N=3$ expériences indépendantes)

Comparativement à la condition contrôle, nos résultats sont cohérents avec un effet répresseur de DDX6 sur la traduction dans notre système. Cependant, aucun effet de Tau sur l’activité répressive de DDX6 n’a pu être mis en évidence en condition contrôle (Fig. 11).

En considérant la sensibilité de Tau au stress (Alavi Naini et al., 2015; Sultan et al., 2011; Vanderweyde et al., 2016) et à l’activité neuronale (Wu et al., 2016), nous avons reconduit ces expériences de tethering assay en induisant un stress cellulaire ou induisant une dépolarisation neuronale. Notre hypothèse est que Tau joue un rôle dans la modulation de la répression traductionnelle assurée par DDX6 lors de ces phénomènes cellulaires. Nous avons

privé les cellules de serum de veau fœtal lors des 24 dernières heures (Fig. 12A) de l'expérience ou induit une activité neuronale prolongée par exposition à 55mM de KCl pendant 30 minutes (Fig. 12B) (Madabhushi et al., 2015).

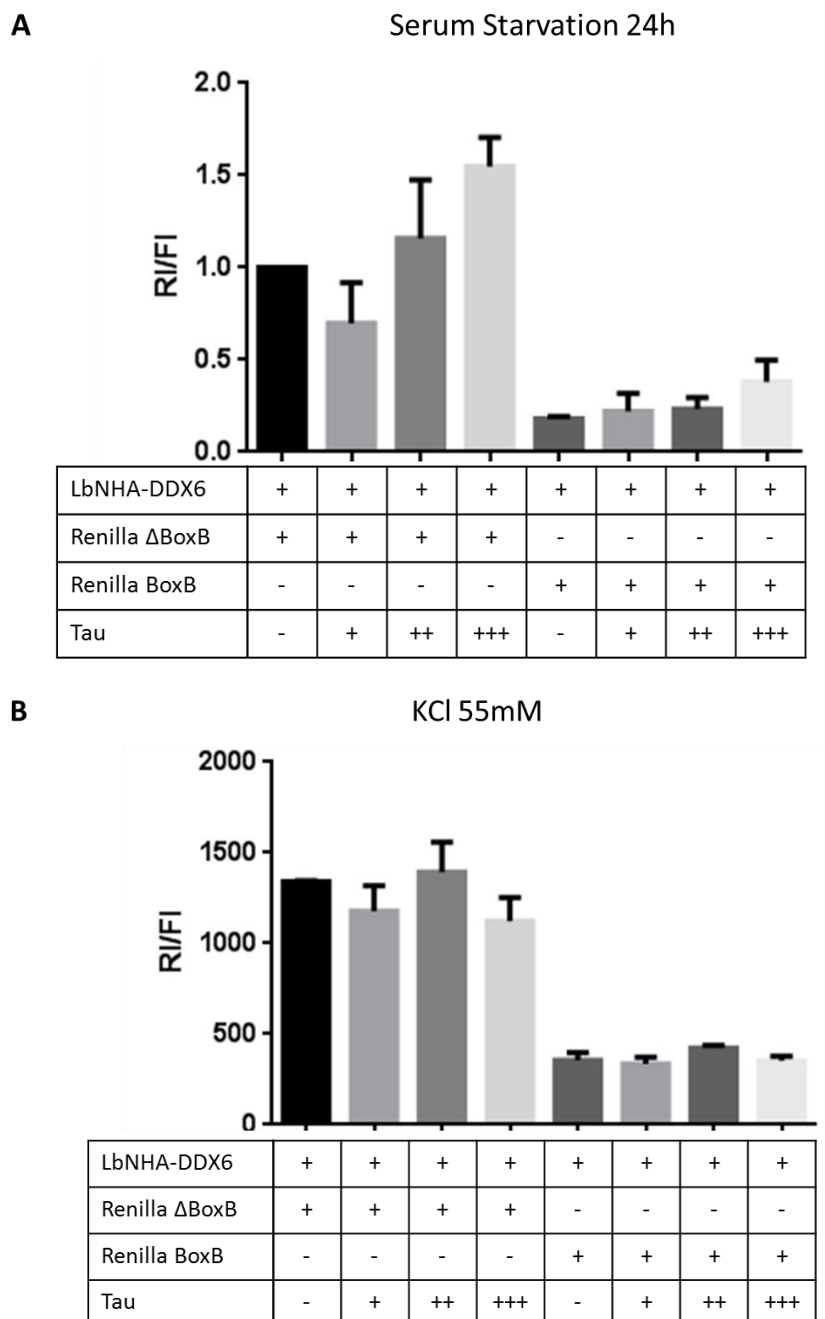


Figure 12 – Tau ne module pas l'effet répressur de la traduction de DDX6 dans notre système expérimental de tethering assay en conditions de privation de serum de veau fœtal (A) et lors d'une activité neuronale prolongée (B). Diagrammes montrant l'effet de Tau sur la répression traductionnelle générale induite par DDX6 en condition de privation de serum de veau fœtal ou d'activité neuronale prolongée. Les cellules SH-SY5Y sont co-transfectées avec les plasmides codant LbNHA-DDX6, Renilla ΔBoxB ou Renilla BoxB, un contrôle interne firefly luciférase et un vecteur vide. Des quantités croissantes de plasmides codant la protéine

Tau46 (2+3-10+) sont co-transfectées. (A) 24 heures avant la lyse des cellules, le serum de veau fœtal est supprimé du milieu de culture. (B) 30 minutes avant la lyse des cellules, celles-ci sont exposées pendant 30 minutes à 55mM de KCl. Les valeurs d'activité Renilla sont normalisées sur l'activité firefly luciférase du contrôle interne. (mean $\pm$ SEM, $N = 3$ expériences indépendantes)

Nous observons une tendance non-significative à l'augmentation de l'activité traductionnelle de DDX6 au maximum d'expression de Tau sous l'effet de la privation de serum de veau fœtal (Fig. 12A). Cependant, cette tendance est conservée dans la condition contrôle correspondante. Tau ne module pas l'effet répresseur général de DDX6 en condition de privation de serum de veau fœtal dans notre système de tethering assay.

Aucun effet de la protéine Tau sur la répression traductionnelle assurée par DDX6 n'a été mis en évidence lors d'une dépolarisation prolongée des cellules de neuroblastome SH-SY5Y dans notre système de tethering assay (Fig. 12B).

V. Le complexe Tau-DDX6 est impliqué dans la régulation de l'activité du miARN Let-7a dans les cellules SH-SY5Y.

Outre l'implication de DDX6 dans la répression générale de la traduction (Coller and Parker, 2005), cette hélicase à ARN joue également un rôle dans la répression de la traduction d'ARNm spécifiques par la voie des miARN (Chu and Rana, 2006; Eulalio et al., 2007). Notre hypothèse est que Tau module l'activité des miARN à travers son interaction avec DDX6. Afin de tester cette hypothèse, nous avons sélectionné le miARN let-7a. C'est un miARN régulièrement utilisé comme modèle, fortement exprimé dans les neurones et dont l'activité est modulée par DDX6 (Nicklas et al., 2015). Afin de mesurer l'activité de let-7a dans les cellules SH-SY5Y, nous utilisons un système rapporteur luciférase. Le rapporteur let-7a sauvage code une luciférase firefly suivie en 3'UTR par quatre sites de liaisons pour let-7a. Le rapporteur let-7a muté code une luciférase firefly suivie de quatre sites de liaisons mutés qui ne peuvent s'apparier avec la région seed de let-7a (Nicklas et al., 2015). Ainsi, lorsqu'un miARN actif let-7a se fixe sur son site de liaison en 3'UTR du rapporteur sauvage, il inhibe la traduction ou dégrade l'ARNm. En conséquence, il n'y a pas d'émission de bioluminescence. Dans le cas où ce rapporteur ne rencontre pas de miARN let-7a actif, il est traduit et une bioluminescence est émise. Le rapporteur let-7a muté sert de contrôle, le miARN let-7a n'a pas d'effet sur sa

traduction. Dans le but de tester l'effet de Tau sur l'activité de ce miARN, un plasmide codant la protéine Tau46 (2+3-10+), est co-transfecté avec ce système rapporteur.

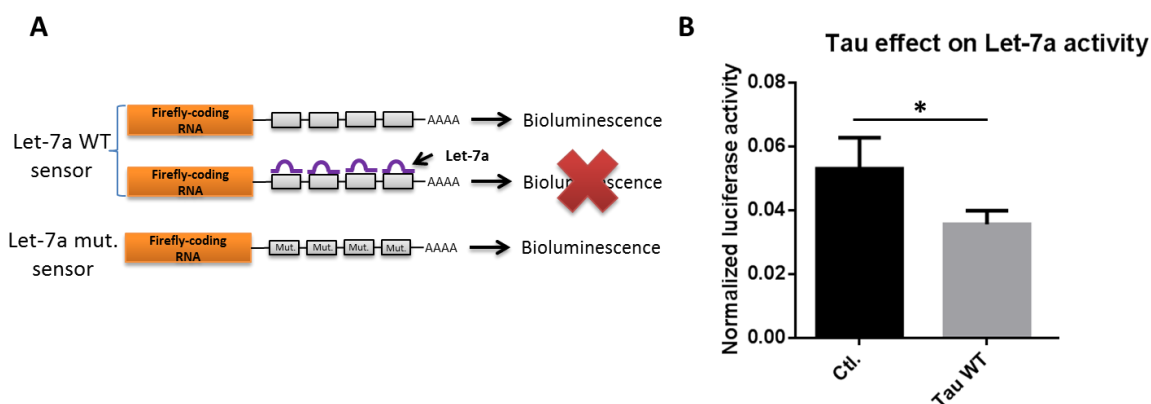


Figure 13 – Tau stimule l'activité de Let-7a. (A) Schéma représentant les rapporteurs luciférases utilisés pour mesurer l'activité de let-7a endogène dans les cellules SH-SY5Y. Le let-7a WT sensor code une luciférase firefly suivie en 3'UTR par quatre sites de liaisons pour la région seed de let-7a. En absence de let-7a, ce rapporteur est traduit, une bioluminescence est émise. En présence de let-7a actif, celui-ci se fixe au niveau de ces sites de liaison et réprime la traduction du rapporteur. Il n'y a pas d'émission de bioluminescence. Le rapporteur let-7a mut. présente des sites de liaisons mutés empêchant la fixation de let-7a. Il constitue un rapporteur contrôle dont l'activité luciférase est indépendante de let-7a. Un rapporteur luciférase renilla est utilisé en contrôle interne (adapté de Nicklas et al., 2015) (B) Diagramme montrant l'effet de la sur-expression de Tau46 (2+3-10+) sur l'activité luciférase du rapporteur sauvage normalisée sur l'activité du rapporteur muté. (mean $\pm$ SEM, $N = 6$ expériences indépendantes, test de Wilcoxon-Mann-Whitney, * $P < 0.05$).

Lorsque Tau est sur-exprimée dans les cellules SH-SY5Y, on observe une diminution significative de l'activité luciférase correspondant à une augmentation de l'activité de let-7a. En d'autres termes, Tau stimule l'activité de let-7a (Fig. 13).

Dans le but de confirmer cet effet de Tau sur l'activité de let-7a, nous nous sommes intéressés à l'impact de la sur-expression de Tau sur les ARNm cibles de let-7a dans les SH-SY5Y. Parmi les gènes cibles, nous avons sélectionné le facteur de transcription c-Myc. Ce proto-oncogène est exprimé dans les SH-SY5Y et sa demi-vie est courte (Gregory and Hann, 2000). Son expression a été mesurée au niveau des ARNm par Q-PCR (Fig. 14A) et au niveau protéique par immuno-empreinte (Fig. 14B). La sur-expression de Tau n'a pas d'effet significatif sur le niveau d'expression d'ARNm de c-Myc (Fig. 14A). En revanche, Tau induit une diminution significative de la quantité de protéine c-Myc (Fig. 14B). Ces résultats suggèrent que si Tau n'induit pas la dégradation des ARNm de c-Myc, elle inhibe leur traduction. Dans les cellules SH-SY5Y, nous avons montré, par un système rapporteur

luciférase, que Tau stimule l'activité du miARN let-7a et, par immuno-empreinte, que Tau inhibe la traduction d'une cible de let-7a : c-Myc. Ensemble, ces résultats appuient le rôle activateur de Tau vis-à-vis de l'activité de let-7a.

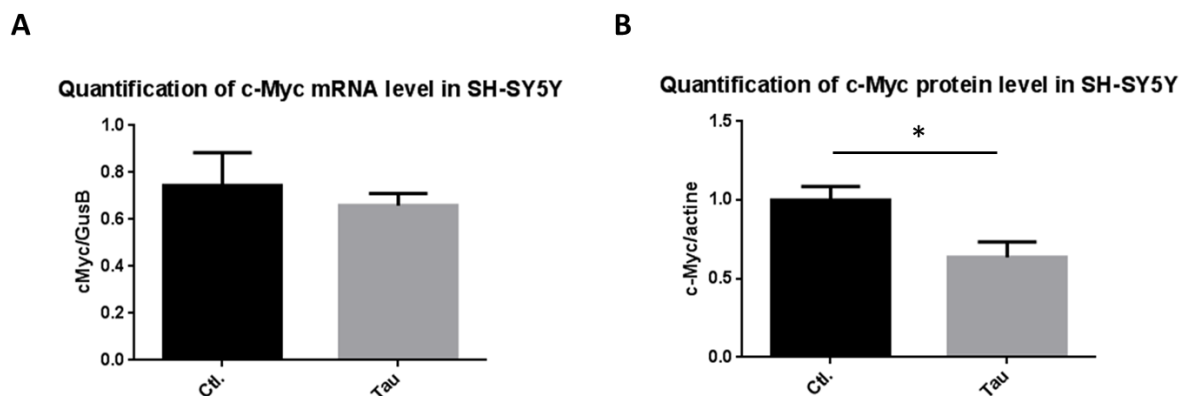


Figure 14 – Tau réprime la traduction de c-Myc, un ARNm cible de let-7a. Le niveau d'expression de c-Myc est analysée par Q-PCR et immuno-empreinte à partir de cellules SH-SY5Y 24h après la transfection d'un plasmide codant la protéine Tau46 (2+3-10+) ou d'un vecteur vide. (A) Diagramme de quantification de l'expression de l'ARNm c-Myc. Son expression est normalisée par l'expression du gène régérence GUSB. (B) Diagramme illustrant la quantification de la protéine c-Myc réalisé à partir d'immuno-empreintes. Le signal de c-Myc est normalisée sur le signal de la β -actine. (mean $\pm$ SEM, $N = 3$ expériences indépendantes, test de Mann-Whitney, $*P < 0.05$).

Afin de tester si l'effet de Tau sur l'activité du miARN let-7a dépend de DDX6, les cellules SH-SY5Y sont préalablement transfectées avec un pool de siARN dirigée contre DDX6 avant la co-transfection des plasmides codant les rapporteurs luciférase et Tau. Il en résulte une diminution de la quantité de DDX6 d'environ 50% (Fig. 15A).

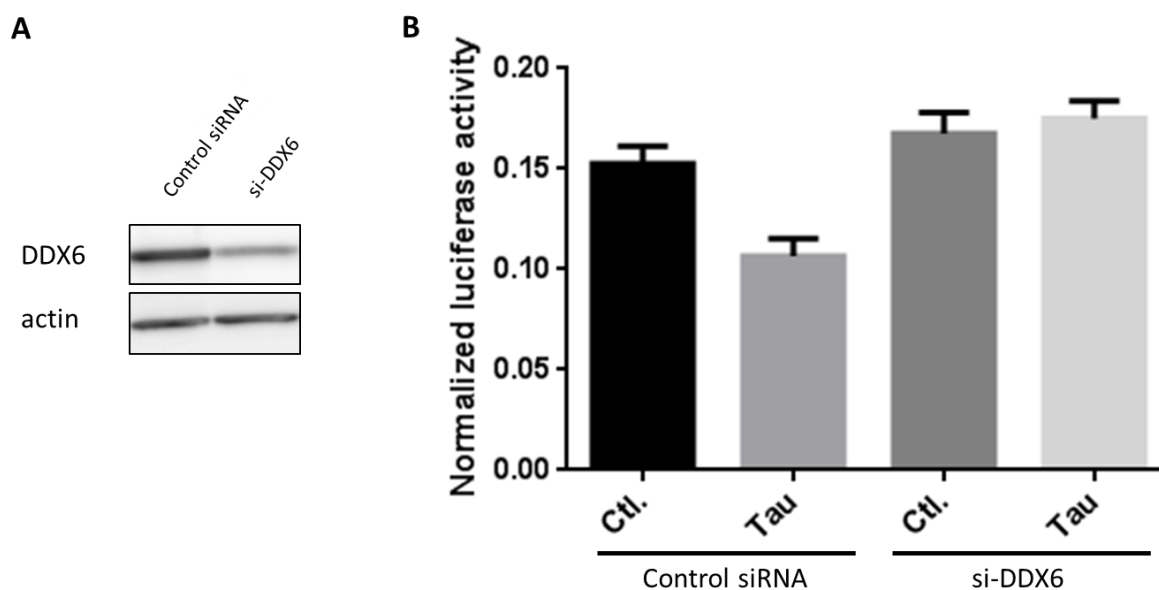


Figure 15 – L’effet activateur de Tau sur l’activité de let-7a est dépendant de DDX6. (A) L’efficacité de la déplétion des cellules SH-SY5Y est testée par immuno-empreinte à l’aide d’un anticorps anti-DDX6. La β -actine sert de protéine de charge. (B) Effet de la sur-expression de Tau46 (2+3-10+) sur l’activité normalisée des rapporteurs luciférase let-7a dans des cellules SH-SY5Y transfectées préalablement avec un pool contrôle de siARN et un pool de siARN dirigé contre DDX6. (mean $\pm$ SEM, $N = 2$ expériences indépendantes)

Comparativement aux cellules SH-SY5Y transfectées avec un pool de siARN contrôle, la déplétion en DDX6 abolit l’effet stimulateur de Tau sur l’activité du miARN let-7a (Fig. 15B). Cela suggère que l’implication de Tau dans l’activité de let-7a est dépendante de DDX6. En vue de démontrer le rôle du complexe Tau-DDX6 dans la régulation de l’activité de let-7a, nous devons tester l’effet de mutants de Tau dont l’interaction avec DDX6 est affaiblie sur l’activité de let-7a. Pour cela nous disposons des mutants de Tau P301L et P301S. A l’heure où ce manuscrit est écrit, seul l’effet de Tau P301S a été testé (Fig. 16).

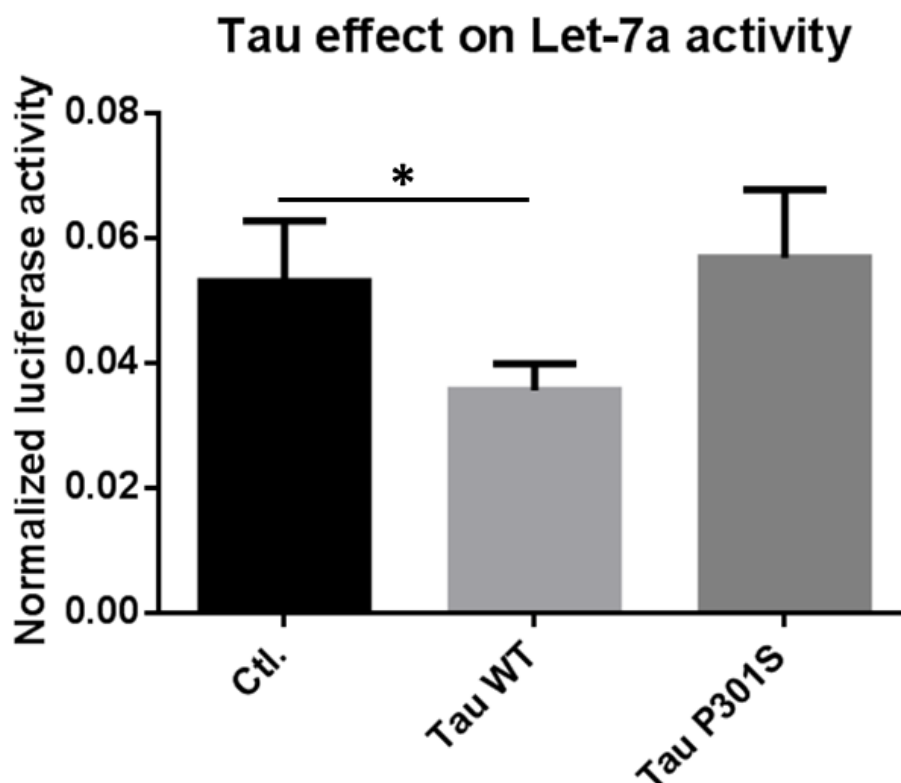


Figure 16 – Le mutant Tau P301S abolit l’effet de Tau sur l’activité de let-7a. Effet de la sur-expression de Tau46 (2+3-10+) sauvage (mean ± SEM, $N = 6$ expériences indépendantes, test de Mann-Whitney, $*P < 0.05$). et du mutant Tau46 (2+3-10+) P301S (mean ± SEM, $N = 3$ expériences indépendantes) sur l’activité normalisée des rapporteurs luciférase let-7a dans des cellules SH-SY5Y.

Comparativement à la protéine Tau sauvage, le mutant Tau P301S présente une affinité moindre pour DDX6. Or, cette diminution de l’interaction résulte en une abolition de l’effet de Tau sur l’activité de let-7a (Fig. 16). L’effet de Tau sur l’activité de let-7a dépend de l’interaction Tau-DDX6. Cette expérience suggère que le complexe Tau-DDX6 est impliqué dans la régulation de l’activité du miARN let-7a.

De surcroît, la mutation P301S est impliquée dans les formes familiales de tauopathies. Nos résultats tendent ainsi à mettre en évidence une perte de fonction du mutant P301S. Ce point soulève de nombreuses perspectives quant à l’étude de l’impact de la pathologie sur l’étude de ce rôle atypique de Tau dans la voie des miARN.

D. Discussion & Perspectives

I. Tau interagit avec DDX6.

Nous avons mis en évidence une interaction de Tau avec DDX6 par trois méthodes différentes, résultat qui est soutenu par l'analyse de l'interactome de Tau, étude dans laquelle une interaction de Tau avec DDX6 est également mise en évidence (Gunawardana et al., 2015). Dans la fraction nucléaire des SH-SY5Y, nous avons pu observer deux bandes tandis que le signal du cytosol n'est constitué que d'une seule bande. Ces deux bandes ont déjà été observées dans la fraction nucléaire et microsomiale d'un homogénat de testicules de rats (Kawahara et al., 2014). Un signal DDX6 composé d'au moins trois bandes de poids moléculaire différents pour DDX6 ont également été mis en évidence dans des lysats de tissus murins, tels que le cerveau, la rate, le muscle squelettique ou encore le testicule. Nous utilisons un anticorps anti-DDX6 dont l'épitope est située à l'extrémité C-terminale. Ceci suggère une protéine raccourcie à l'extrémité N-terminale. Akao et collaborateurs proposent l'existence d'un codon d'initiation de la traduction alternatif (Akao and Nakagawa, 2006). Il apparaît que la bande de plus haut poids moléculaire soit enrichie dans les fractions co-purifiées avec Tau comparativement aux inputs suggérant une interaction plus forte de cette forme de haut poids moléculaire. Une immuno-précipitation de ces variants couplée à une analyse par spectrométrie de masse pourrait permettre de les identifier (Derisbourg et al., 2015). Toutefois, nous ne pouvons exclure que ces variants de migration ne soient pas le fruit de modifications post-traductionnelles. Si peu de choses sont connues sur les modifications post-traductionnelles de DDX6, il a notamment été montré que DDX6 pouvait être sumoylée (Bish et al., 2015; Grant, 2010).

DDX6 interagit avec des partenaires différents selon la voie dans laquelle DDX6 se trouve engagée. Une méthode Tap-tag couplée à une co-immunoprécipitation pourrait permettre d'identifier d'autres partenaires du complexe Tau-DDX6 et d'en préciser la fonction. A ce titre, l'analyse de l'interactome de Tau fournit des éléments intéressants. En effet, d'après cette étude, Tau interagit avec des partenaires de DDX6 tel que EDC3, activateur du décoiffage ou des sous-unités du complexe CCR4-NOT, impliquées dans la régulation de la traduction (Gunawardana et al., 2015). Ce point constitue un jalon dans la recherche d'une fonctionnalité au complexe Tau-DDX6.

D'après nos résultats de « proximity ligation assay », cette interaction entre Tau et DDX6 s'opérerait principalement dans le cytoplasme, ce qui est cohérent avec notre hypothèse

d'une implication du complexe Tau-DDX6 dans la régulation de la traduction. Néanmoins, une proximité étroite entre Tau et DDX6 existe également, en plus faible proportion dans le compartiment nucléaire. Une localisation au niveau de l'hétérochromatine et du nucléole a été mis en évidence pour Tau ainsi que pour DDX6, ce qui est cohérent avec nos résultats de « proximity ligation assay » (Kawahara et al., 2014; Sjöberg et al., 2006).

II. Tau interagit avec DDX6 via la partie carboxy-terminale de son domaine riche en proline et son troisième domaine de liaison aux microtubules.

Nous avons mis en évidence que Tau interagit avec DDX6 via la partie carboxy-terminale de son domaine riche en proline et son troisième domaine de liaison aux microtubules, deux régions potentiellement nécessaires à la liaison de Tau aux ARN (Wang et al., 2006b). En conséquence, l'interaction de Tau-DDX6 pourrait être modulée par la présence d'ARN. Il serait intéressant de tester si la présence d'ARN stabilise ou non ce complexe. Nous nous sommes concentrés à étudier uniquement les régions de Tau impliquées dans l'interaction Tau-DDX6. Identifier réciproquement les régions de DDX6 impliquées dans l'interaction avec Tau pourrait nous renseigner sur les partenaires du complexe Tau-DDX6. En effet, certains partenaires de DDX6 utilisent le même motif de liaison pour interagir avec DDX6. En conséquence, il en résulte des interactions mutuellement exclusives (Sharif et al., 2013; Tritschler et al., 2009). Ainsi, identifier la région de fixation de Tau sur DDX6 nous renseignerait sur la place de Tau dans la mécanistique de répression traductionnelle et de dégradation des ARN.

III. Le complexe Tau-DDX6 régule l'activité du miARN let-7a dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y.

C'est la première fois qu'est mis en évidence une régulation de l'activité d'un miARN par la protéine Tau. Lorsque les cellules SH-SY5Y sont déplétées en DDX6 d'environ 50%, l'effet de Tau sur l'activité de let-7a est abolie. Cet effet est dépendant de DDX6. Dans notre système, l'expression d'un mutant de Tau dont l'interaction avec DDX6 est diminuée, abolit également l'effet de Tau. Cette observation suggère que l'interaction Tau-DDX6 est cruciale pour la régulation de l'activité de let-7a dans les cellules SH-SY5Y.

Sans toutefois disposer de résultats abondant dans ce sens, il est envisageable que l'implication de Tau sur l'activité des miARN ne soit pas restreinte au miARN let-7a et que Tau puisse avoir une action générale sur l'activité des miARN, à l'image de DDX6.

IV. Rôle biologique de la régulation de l'activité de let-7a par la protéine Tau.

A ce stade, rien ne nous permet d'affirmer qu'un processus cellulaire est régulé par l'action du complexe Tau-DDX6 sur l'activité du miARN let-7a. Néanmoins, au vu du rôle de let-7a dans la différenciation des cellules souches neuronales (Aranha et al., 2010; Nicklas et al., 2015; Song et al., 2015), il serait tentant d'émettre l'hypothèse que Tau participe à la régulation de la différenciation neuronale en agissant sur let-7a. En effet, des études montrent que la différenciation neuronale est accompagnée de l'augmentation de l'expression des isoformes Tau4R (Smith et al., 1995) et que cette isoforme jouerait un rôle déterminant dans la différenciation neuronale (Sennvik et al., 2007). Une piste de recherche pourrait consister à étudier les relations entre les différentes isoformes de Tau, l'activité de let-7a et la différenciation neuronale.

V. D'autres rôles potentiels pour le complexe Tau-DDX6.

Dans des cultures primaires de neurones déficients en Tau, TIA-1, un des principaux composants des granules de stress est principalement localisée dans le noyau. Lorsque Tau est exprimée, TIA-1 est partiellement relocalisée dans le compartiment somato-dendritique notamment sous forme granulaire. Ce résultat suggère que Tau pourrait jouer un rôle dans le transport des granules de stress. De plus, il ressort de cette étude que Tau est impliquée dans la formation des granules de stress (Vanderweyde et al., 2016). La biologie de Tau est modulée par le stress (Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014). Tau pourrait être impliquée dans la réponse au stress oxydant en régulant la formation ou le transport de granules à ARN. La formation des P-bodies peut également être induite par un stress oxydant, résultant par exemple d'un traitement à l'arsenic (Anderson et al., 2015; Ayache et al., 2015; Bernstam and Nriagu, 2000; Ruiz-Ramos et al., 2009). DDX6 est essentielle dans la formation des P-bodies (Ayache et al.,

2015). Une hypothèse est que Tau pourrait être également impliquée dans la formation des P-bodies des neurones au travers de son interaction avec DDX6.

Au sein de granules neuronaux, DDX6 régule la traduction de protéines modulant la plasticité synaptique (Barbee et al., 2006; Hillebrand et al., 2010; Sudhakaran et al., 2014). Une autre fonction potentielle du couple Tau-DDX6 pourrait être la régulation de l'expression de protéines impliquées dans des mécanismes mnésiques.

VI. Impact de la pathologie Tau sur l'activité de let-7a.

Nous avons montré *in vitro* que les mutations pathologiques P301S et P301L, impliquées dans des formes familiales de tauopathies altèrent l'interaction entre Tau et DDX6. De plus, Tau P301S prévient l'effet de Tau sur l'activité de let-7a. Ces observations suggèrent que la pathologie Tau affecte le rôle de Tau dans la régulation de let-7a et, par voie de conséquence, la pathologie Tau pourrait altérer l'expression de nombreux gènes cibles de let-7a. Il serait intéressant de tester l'effet de la phosphorylation de Tau, notamment par l'utilisation de mutants phospho-mimétiques sur l'interaction Tau-DDX6 et l'activité de let-7a. En parallèle, l'expression des gènes cibles de let-7a pourrait être analysée dans un modèle transgénique de tauopathie tel que les souris Thy-Tau22 ou dans des cerveaux de patients atteints de tauopathie.

VII. Pathologie Tau et granules à ARN.

Au sein des cellules, le stress induit l'agrégation de protéines de liaison à l'ARN conduisant à la formation de granules de stress composés d'ARN et de protéines. Ces granules vont permettre de s'adapter rapidement au stress, en séquestrant ces ARNm. Récemment, il a été montré que TIA-1, un des principaux composants des granules de stress promeut le mésappariement pathologique de Tau (Vanderweyde et al., 2016) et serait impliqué dans la propagation de la pathologie Tau (Brunello et al., 2016). L'équipe du Dr Wlozin et collaborateurs suggèrent que ces granules sont impliqués dans l'agrégation de ribonucléoprotéines dans les maladies neurodégénératives (pour revue, Vanderweyde et al., 2013). DDX6 est un composant essentiel des P-bodies et peut être localisé au sein des granules de stress. Compte tenu de son interaction avec Tau, de sa proximité avec l'ARN, inducteur *in vitro* de l'agrégation de Tau (Kampers et al., 1996), DDX6 pourrait moduler l'agrégation de protéine Tau.

Remerciements

Nous remercions le Dr Dominique Weil et le Dr Michel Kress pour les plasmides rapporteurs associés au tethering assay ainsi que pour le plasmide codant la protéine de fusion GST-DDX6. Nous remercions également le Dr Sven Diederichs pour les plasmides rapporteurs permettant la mesure de l'activité let-7a. Nous remercions le Dr Jean-Charles Lambert pour les plasmides codant les protéines de fusion GST-Tau utilisés pour nos GST-pulldown. Nous remercions également l'IMPRT (Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Lille) pour l'accès à la plate-forme d'imagerie cellulaire et d'interactions moléculaires. Nous remercions également le Dr Andrea Spolcova pour son assistance technique pour les techniques d'immunocytochimie et de proximity ligation assay.

Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence ces points saillants :

Impact de la pathologie Tau sur la fonction protectrice de Tau vis-à-vis des acides nucléiques *in vivo*.

-  L'hyperthermie, générateur de stress oxydant, induit une oligomérisation de Tau dans les neurones présentant une pathologie précoce.
-  Les oligomères de Tau altèrent l'intégrité de l'ADN et l'ARN *in vivo*.
-  Le bleu de méthylène inhibe l'oligomérisation de la protéine Tau et prévient les dommages aux acides nucléiques.

Rôle du complexe Tau-DDX6 dans le métabolisme des ARN.

-  La protéine Tau interagit avec DDX6.
-  Le complexe Tau-DDX6 stimule l'activité du miARN let-7a dans des cellules de neuroblastome SH-SY5Y.
-  Les mutations pathologiques P301S et P301L altèrent la liaison de Tau avec DDX6.
-  La mutation pathologique P301S abolit la capacité de Tau à réguler l'activité du miARN let-7a.

Le fil rouge de ce travail de thèse fut d'étudier les fonctions atypiques de la protéine Tau. Initialement identifiée comme une protéine cytosolique impliquée dans la stabilisation et la polymérisation des microtubules, il apparaît que Tau possède d'autres localisations et d'autres fonctions. En effet, des hypothèses concernant notamment des fonctions nucléaires, synaptiques ou extra-cellulaires de Tau émergent de la littérature scientifique. Au sein du laboratoire, nos résultats s'inscrivent dans cette perspective. Nous avons pu mettre en évidence *in vivo* que Tau protège les acides nucléiques du stress hyperthermique dans le compartiment nucléaire et cytosolique. Nous avons également montré que Tau pourrait jouer un rôle dans la régulation de la traduction au travers des mécanismes de micro-ARN.

Cette multiplicité des fonctions de Tau enrichit nos perspectives quant au rôle neurotoxique que peut revêtir la protéine Tau. En effet, il s'agit alors de s'intéresser à l'impact de la pathologie Tau sur ces fonctions cellulaires et, réciproquement, de leurs contributions dans l'apparition de la pathologie Tau. Au cours de cette thèse, nous avons montré l'effet délétère des oligomères toxiques de Tau sur sa capacité protectrice vis-à-vis des acides nucléiques. En parallèle, nous avons mis en évidence que la mutation pathologique P301S de Tau abolit la capacité de Tau à réguler l'activité du micro-ARN let-7a. Ensemble, ces résultats suggèrent que la pathologie Tau prévient la faculté de Tau à assurer ses fonctions cellulaires nouvellement découvertes.

Bibliographie

- Abdel-Monem, M., Dürwald, H., and Hoffmann-Berling, H. (1976). Enzymic unwinding of DNA. 2. Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme. *Eur. J. Biochem.* 65, 441–449.
- Ahmed, T., Van der Jeugd, A., Blum, D., Galas, M.-C., D’Hooge, R., Buee, L., and Balschun, D. (2014). Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol. Aging* 35, 2474–2478.
- Akao, Y., and Nakagawa, Y. (2006). Expression of the DEAD-box/RNA helicase rck/p54 in mouse tissues: implications for heterogeneous protein expression. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 955–960.
- Akao, Y., Seto, M., Takahashi, T., Saito, M., Utsumi, K.R., Nakazawa, S., and Ueda, R. (1991). Rearrangements on chromosome 11q23 in hematopoietic tumor-associated t(11;14) and t(11;19) translocations. *Cancer Res.* 51, 6708–6711.
- Akao, Y., Seto, M., Yamamoto, K., Iida, S., Nakazawa, S., Inazawa, J., Abe, T., Takahashi, T., and Ueda, R. (1992). The RCK gene associated with t(11;14) translocation is distinct from the MLL/ALL-1 gene with t(4;11) and t(11;19) translocations. *Cancer Res.* 52, 6083–6087.
- Akao, Y., Marukawa, O., Morikawa, H., Nakao, K., Kamei, M., Hachiya, T., and Tsujimoto, Y. (1995). The rck/p54 candidate proto-oncogene product is a 54-kilodalton D-E-A-D box protein differentially expressed in human and mouse tissues. *Cancer Res.* 55, 3444–3449.
- Alarcon, J.M., Hodgman, R., Theis, M., Huang, Y.-S., Kandel, E.R., and Richter, J.D. Selective modulation of some forms of schaffer collateral-CA1 synaptic plasticity in mice with a disruption of the CPEB-1 gene. *Learn. Mem.* 11, 318–327.
- Alavi Naini, S.M., Soussi-Yanicostas, N., Alavi Naini, S.M., and Soussi-Yanicostas, N. (2015). Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1–17.
- Alonso, A. d. C., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6923–6928.
- Alonso, A. d. C., Li, B., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2006). Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8864–8869.
- Alonso, A. del C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2004). Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J. Biol. Chem.* 279, 34873–34881.
- Alonso, A.C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5562–5566.
- Alonso, A.C., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). Alzheimer’s disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles

microtubules. *Nat. Med.* 2, 783–787.

Alonso, A.D., Di Clerico, J., Li, B., Corbo, C.P., Alaniz, M.E., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2010). Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 285, 30851–30860.

Amos, L.A., Hirokawa, N., Vale, R.D., Chrétien, D., Wade, R.H., Wade, R.H., Chretien, D., Job, D., Fukushige, T., Siddiqui, Z.K., et al. (2004). Microtubule structure and its stabilisation. *Org. Biomol. Chem.* 2, 2153.

Anderson, P., Kedersha, N., and Ivanov, P. (2015). Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1849, 861–870.

Andreadis, A., Brown, W.M., and Kosik, K.S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626–10633.

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

Andreou, A.Z., and Klostermeier, D. (2013). The DEAD-box helicase eIF4A: paradigm or the odd one out? *RNA Biol.* 10, 19–32.

Aranha, M.M., Santos, D.M., Xavier, J.M., Low, W.C., Steer, C.J., Solá, S., Rodrigues, C.M., Doetsch, F., Temple, S., Maimets, T., et al. (2010). Apoptosis-associated microRNAs are modulated in mouse, rat and human neural differentiation. *BMC Genomics* 11, 514.

Arendt, T., Stieler, J., Strijkstra, A.M., Hut, R.A., Rüdiger, J., Van der Zee, E.A., Harkany, T., Holzer, M., and Härtig, W. (2003). Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J. Neurosci.* 23, 6972–6981.

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

Ashman, J.B., Hall, E.S., Eveleth, J., and Boekelheide, K. (1992). Tau, the neuronal heat-stable microtubule-associated protein, is also present in the cross-linked microtubule network of the testicular spermatid manchette. *Biol. Reprod.* 46, 120–129.

Atkins, C.M., Nozaki, N., Shigeri, Y., and Soderling, T.R. (2004). Cytoplasmic polyadenylation element binding protein-dependent protein synthesis is regulated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurosci.* 24, 5193–5201.

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

Ayache, J., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., and Weil, D. (2015). P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Mol. Biol. Cell* 26, 2579–2595.

Baba, Y., Tsuboi, Y., Baker, M.C., Uitti, R.J., Hutton, M.L., Dickson, D.W., Farrer, M., Putzke, J.D., Woodruff, B.K., Ghetti, B., et al. (2005). The effect of tau genotype on clinical features in FTDP-17. *Parkinsonism Relat. Disord.* 11, 205–208.

Bancher, C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Fried, V.A., Smith, H.T., and Wisniewski, H.M. (1991). Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Brain Res.* 539, 11–18.

- Banroques, J., Doère, M., Dreyfus, M., Linder, P., and Tanner, N.K. (2010). Motif III in superfamily 2 “helicases” helps convert the binding energy of ATP into a high-affinity RNA binding site in the yeast DEAD-box protein Ded1. *J. Mol. Biol.* 396, 949–966.
- Barbee, S.A., Estes, P.S., Cziko, A.-M., Hillebrand, J., Luedeman, R.A., Collier, J.M., Johnson, N., Howlett, I.C., Geng, C., Ueda, R., et al. (2006). Staufen- and FMRP-Containing Neuronal RNPs Are Structurally and Functionally Related to Somatic P Bodies. *Neuron* 52, 997–1009.
- Barghorn, S., Zheng-Fischhöfer, Q., Ackmann, M., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry* 39, 11714–11721.
- de Barreda, E.G., Dawson, H.N., Vitek, M.P., and Avila, J. (2010). Tau deficiency leads to the upregulation of BAF-57, a protein involved in neuron-specific gene repression. *FEBS Lett.* 584, 2265–2270.
- Bashkirov, V.I., Scherthan, H., Solinger, J.A., Buerstedde, J.M., and Heyer, W.D. (1997). A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J. Cell Biol.* 136, 761–773.
- Beilharz, T.H., Humphreys, D.T., Clancy, J.L., Thermann, R., Martin, D.I.K., Hentze, M.W., and Preiss, T. (2009). microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *PLoS One* 4, e6783.
- Bekris, L.M., Yu, C.-E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23, 213–227.
- Berger, Z., Roder, H., Hanna, A., Carlson, A., Rangachari, V., Yue, M., Wszolek, Z., Ashe, K., Knight, J., Dickson, D., et al. (2007). Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J. Neurosci.* 27, 3650–3662.
- Berger-Sweeney, J., Zearfoss, N.R., and Richter, J.D. Reduced extinction of hippocampal-dependent memories in CPEB knockout mice. *Learn. Mem.* 13, 4–7.
- Bernstam, L., and Nriagu, J. Molecular aspects of arsenic stress. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 3, 293–322.
- Bertoncini, C.R., and Meneghini, R. (1995). DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleic Acids Res.* 23, 2995–3002.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 513–521.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11, 153–163.
- Black, M.M., Slaughter, T., Moshiah, S., Obrocka, M., and Fischer, I. (1996). Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J. Neurosci.* 16, 3601–3619.
- Bloom, G.S. (2014). Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol.* 71, 505–508.
- Boyne, L.J., Tessler, A., Murray, M., and Fischer, I. (1995). Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *J. Comp. Neurol.* 358, 279–293.

- Braak, H., and Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging* 18, 351–357.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2013). Evolutional Aspects of Alzheimer's Disease Pathogenesis. *J. Alzheimer's Dis.* 33, S155–S161.
- Braak, E., Braak, H., and Mandelkow, E.M. (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol.* 87, 554–567.
- Braak, H., Thal, D.R., Ghebremedhin, E., and Del Tredici, K. (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 960–969.
- Bradley-Whitman, M.A., Timmons, M.D., Beckett, T.L., Murphy, M.P., Lynn, B.C., and Lovell, M.A. (2014). Nucleic acid oxidation: an early feature of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 128, 294–304.
- Brady, R.M., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol. Aging* 16, 479–486.
- Brandt, R., Léger, J., and Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* 131, 1327–1340.
- Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol. Cell* 44, 120–133.
- Brengues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310, 486–489.
- Brion et al. (1985). Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d' Alzheimer. *Arch Biol* 95- 229-235.
- Brion, J.P., Smith, C., Couck, A.M., Gallo, J.M., and Anderton, B.H. (1993). Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 61, 2071–2080.
- de Bruijn, R.F.A.G., Bos, M.J., Portegies, M.L.P., Hofman, A., Franco, O.H., Koudstaal, P.J., and Ikram, M.A. (2015). The potential for prevention of dementia across two decades: the prospective, population-based Rotterdam Study. *BMC Med.* 13, 132.
- Brunello, C.A., Yan, X., Huttunen, H.J., Gerstberger, S., Hafner, M., Tuschl, T., Neelamraju, Y., Hashemikhabir, S., Janga, S.C., Kim, H.J., et al. (2016). Internalized Tau sensitizes cells to stress by promoting formation and stability of stress granules. *Sci. Rep.* 6, 30498.
- Bruno, I., and Wilkinson, M.F. (2006). P-Bodies React to Stress and Nonsense. *Cell* 125, 1036–1038.
- Bruskov, V.I., Malakhova, L. V, Masalimov, Z.K., and Chernikov, A. V (2002). Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res.* 30, 1354–1363.
- Bryan, J.B., Nagle, B.W., and Doenges, K.H. (1975). Inhibition of tubulin assembly by RNA and other polyanions: evidence for a required protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3570–3574.
- Bugiani, O., Murrell, J.R., Giaccone, G., Hasegawa, M., Ghigo, G., Tabaton, M., Morbin, M.,

- Primavera, A., Carella, F., Solaro, C., et al. (1999). Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 667–677.
- Bish, R., Cuevas-Polo, N., Cheng, Z., Hambardzumyan, D., Munschauer, M., Landthaler, M., Vogel, C. (2015). Comprehensive protein interactome analysis of a key RNA helicase: detection of novel stress granule proteins. *Biomolecules* 5, 1441–1466.
- Bullmann, T., de Silva, R., Holzer, M., Mori, H., and Arendt, T. (2007). Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 17, 98–102.
- Bullmann, T., Holzer, M., Mori, H., and Arendt, T. (2009). Pattern of tau isoforms expression during development in vivo. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 591–597.
- Bullmann, T., Härtig, W., Holzer, M., and Arendt, T. (2010). Expression of the embryonal isoform (0N/3R) of the microtubule-associated protein tau in the adult rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 518, 2538–2553.
- Caceres, A., and Kosik, K.S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461–463.
- Caillet-Boudin, M.-L., Buée, L., Sergeant, N., and Lefebvre, B. (2015). Regulation of human MAPT gene expression. *Mol. Neurodegener.* 10, 28.
- de Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D.H., Kopeikina, K.J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K.H., Carlson, G.A., et al. (2012). Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 73, 685–697.
- Camero, S., Benítez, M.J., Cuadros, R., Hernández, F., Avila, J., and Jiménez, J.S. (2014a). Thermodynamics of the interaction between Alzheimer's disease related tau protein and DNA. *PLoS One* 9, e104690.
- Camero, S., Benítez, M.J., Barrantes, A., Ayuso, J.M., Cuadros, R., Avila, J., and Jiménez, J.S. (2014b). Tau protein provides DNA with thermodynamic and structural features which are similar to those found in histone-DNA complex. *J. Alzheimers. Dis.* 39, 649–660.
- Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J., Canudas, A.M., and Pallàs, M. (2006). The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect.* 19, 453–460.
- Carter, C.J. (2011). Alzheimer's disease plaques and tangles: cemeteries of a pyrrhic victory of the immune defence network against herpes simplex infection at the expense of complement and inflammation-mediated neuronal destruction. *Neurochem. Int.* 58, 301–320.
- Caruthers, J.M., and McKay, D.B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 123–133.
- Caruthers, J.M., Johnson, E.R., and McKay, D.B. (2000). Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13080–13085.
- Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., et al. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci. Transl. Med.* 3, 89ra57.
- Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C., and Sleegers, K. (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet. Med.* 18, 421–430.

- Chai, X., Dage, J.L., and Citron, M. (2012). Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol. Dis.* *48*, 356–366.
- Chang, E., Kim, S., Yin, H., Nagaraja, H.N., and Kuret, J. (2008). Pathogenic missense MAPT mutations differentially modulate tau aggregation propensity at nucleation and extension steps. *J. Neurochem.* *107*, 1113–1123.
- Chekulaeva, M., Hentze, M.W., and Ephrussi, A. (2006). Bruno Acts as a Dual Repressor of oskar Translation, Promoting mRNA Oligomerization and Formation of Silencing Particles. *Cell* *124*, 521–533.
- Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J.T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1218–1226.
- Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *2*, 167–183.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., and Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* *360*, 674–677.
- Chen, Y., Boland, A., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Bawankar, P., Loh, B., Chang, C.-T., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2014). A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing. *Mol. Cell* *54*, 737–750.
- Chin, S.S., and Goldman, J.E. (1996). Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *55*, 499–508.
- Cho, J.-H., and Johnson, G.V.W. (2003). Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J. Biol. Chem.* *278*, 187–193.
- Chu, C., and Rana, T.M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* *4*, e210.
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., et al. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* *11*, 909–913.
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R.A., Frank, S., Hench, J., Probst, A., Winkler, D.T., Reichwald, J., Staufenbiel, M., et al. (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 9535–9540.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.-Y., and Kirschner, M.W. (1977a). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* *116*, 207–225.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977b). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* *116*, 227–247.
- Cohen, T.J., Guo, J.L., Hurtado, D.E., Kwong, L.K., Mills, I.P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.Y. (2011). The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat. Commun.* *2*, 252.
- Cohen, T.J., Friedmann, D., Hwang, A.W., Marmorstein, R., and Lee, V.M.Y. (2013). The

microtubule-associated tau protein has intrinsic acetyltransferase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 756–762.

Coller, J., and Parker, R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122, 875–886.

Coller, J.M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., and Parker, R. (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 7, 1717–1727.

Corces, V.G., Manso, R., De La Torre, J., Avila, J., Nasr, A., and Wiche, G. (1980). Effects of DNA on microtubule assembly. *Eur. J. Biochem.* 105, 7–16.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17–37.

Couchie, D., and Nunez, J. (1985). Immunological characterization of microtubule-associated proteins specific for the immature brain. *FEBS Lett.* 188, 331–335.

Cougot, N., Babajko, S., and Séraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* 165, 31–40.

Cowan, C.M., and Mudher, A. (2013). Are Tau Aggregates Toxic or Protective in Tauopathies? *Front. Neurol.* 4, 114.

Cross, D.C., Muñoz, J.P., Hernández, P., and Maccioni, R.B. (2000). Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J. Cell. Biochem.* 78, 305–317.

Crowther, T., Goedert, M., and Wischik, C.M. (1989). The repeat region of microtubule-associated protein tau forms part of the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Ann. Med.* 21, 127–132.

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

Cuchillo-Ibanez, I., Seereeram, A., Byers, H.L., Leung, K.-Y., Ward, M.A., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2008). Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *FASEB J.* 22, 3186–3195.

Darnell, J.C., and Richter, J.D. (2012). Cytoplasmic RNA-binding proteins and the control of complex brain function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a012344.

Davis, D.R., Anderton, B.H., Brion, J.P., Reynolds, C.H., and Hanger, D.P. (1997). Oxidative stress induces dephosphorylation of tau in rat brain primary neuronal cultures. *J. Neurochem.* 68, 1590–1597.

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

Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G., and Wahle, E. (2000). Cap-dependent

deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19, 1079–1086.

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

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

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

De Vries, S., Naarmann-de Vries, I.S., Urlaub, H., Lue, H., Bernhagen, J., Ostareck, D.H., and Ostareck-Lederer, A. (2013). Identification of DEAD-box RNA helicase 6 (DDX6) as a cellular modulator of vascular endothelial growth factor expression under hypoxia. *J. Biol. Chem.* 288, 5815–5827.

Dickson, D.W., Crystal, H.A., Bevana, C., Honer, W., Vincent, I., and Davies, P. (1995). Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol. Aging* 16, 285–98–304.

Ding, H., Dolan, P.J., and Johnson, G.V.W. (2008). Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.* 106, 2119–2130.

Ding, Q., Markesbery, W.R., Chen, Q., Li, F., and Keller, J.N. (2005). Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 25, 9171–9175.

Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaaur, E.L.F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319, 1086–1089.

Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* 3, 1141–1154.

Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., Loyens, A., Galas, M.-C., Bousset, L., Melki, R., et al. (2014a). Ectosomes: A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein. *PLoS One* 9, e100760.

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

Duvarci, S., Nader, K., and LeDoux, J.E. (2008). De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learn. Mem.* 15, 747–755.

Duyckaerts, C., and Hauw, J.J. Diagnosis and staging of Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 18, S33–42.

Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 143, 777–794.

- Egaña, J.T., Zambrano, C., Nuñez, M.T., Gonzalez-Billault, C., and Maccioni, R.B. (2003). Iron-induced oxidative stress modify tau phosphorylation patterns in hippocampal cell cultures. *Biometals* 16, 215–223.
- Eichhorn, S.W., Guo, H., McGeary, S.E., Rodriguez-Mias, R.A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S.-H., Ghoshal, K., Villén, J., and Bartel, D.P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol. Cell* 56, 104–115.
- Elbaum-Garfinkle, S., and Rhoades, E. (2012). Identification of an aggregation-prone structure of tau. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 16607–16613.
- Engel, T., Lucas, J.J., Gómez-Ramos, P., Moran, M.A., Avila, J., and Hernández, F. (2006a). Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3 β in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 27, 1258–1268.
- Engel, T., Goñi-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J., and Hernández, F. (2006b). Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 β overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J. Neurochem.* 99, 1445–1455.
- Ernault-Lange, M., Bacconnais, S., Harper, M., Minshall, N., Souquere, S., Boudier, T., Bénard, M., Andrey, P., Pierron, G., Kress, M., et al. (2012). Multiple binding of repressed mRNAs by the P-body protein Rck/p54. *RNA* 18, 1702–1715.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007a). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 9–22.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007b). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3970–3981.
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S.-F., Doerks, T., Dorner, S., Bork, P., Boutros, M., and Izaurralde, E. (2007c). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev.* 21, 2558–2570.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15, 21–32.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., et al. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1211–1217.
- Fekete, T., Rásó, E., Pete, I., Tegze, B., Liko, I., Munkácsy, G., Sipos, N., Rigó, J., and Györffy, B. (2012). Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. *Int. J. Cancer* 131, 95–105.
- Feng, Y., Xia, Y., Yu, G., Shu, X., Ge, H., Zeng, K., Wang, J., and Wang, X. (2013). Cleavage of GSK-3 β by calpain counteracts the inhibitory effect of Ser9 phosphorylation on GSK-3 β activity induced by H₂O₂. *J. Neurochem.* 126, 234–242.
- Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild, B., and Lykke-Andersen, J. (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol. Cell* 20, 905–915.
- Fischer, N., and Weis, K. (2002). The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. *EMBO J.* 21, 2788–2797.

- Flach, K., Hilbrich, I., Schiffmann, A., Gärtner, U., Krüger, M., Leonhardt, M., Waschipky, H., Wick, L., Arendt, T., and Holzer, M. (2012). Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. *J. Biol. Chem.* 287, 43223–43233.
- Flanagan, S.W., Moseley, P.L., and Buettner, G.R. (1998). Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett.* 431, 285–286.
- Foster, N.L., Wilhelmsen, K., Sima, A.A., Jones, M.Z., D’Amato, C.J., and Gilman, S. (1997). Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Ann. Neurol.* 41, 706–715.
- Franscovich, M.L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lanté, F., and Buisson, A. (2014). Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J. Neurosci.* 34, 6084–6097.
- Fratiglioni, L., De Ronchi, D., and Agüero-Torres, H. (1999). Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* 15, 365–375.
- Fratiglioni, L., von Strauss, E., and Winblad, B. (2001). [Epidemiology of aging with focus on physical and mental functional ability]. *Lakartidningen* 98, 552–558.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
- Frost, B., Jacks, R.L., and Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* 284, 12845–12852.
- Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C., and Fujiwara, T. (2014). MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Mol. Cell* 56, 79–89.
- Fukaya, T., Iwakawa, H., and Tomari, Y. (2014). MicroRNAs Block Assembly of eIF4F Translation Initiation Complex in *Drosophila*. *Mol. Cell* 56, 67–78.
- Fuster-Matanzo, A., de Barreda, E.G., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Avila, J., and Hernández, F. (2009). Function of tau protein in adult newborn neurons. *FEBS Lett.* 583, 3063–3068.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., and Hernández, F. (2012). Tau protein and adult hippocampal neurogenesis. *Front. Neurosci.* 6, 104.
- Galas, M.-C., Dourlen, P., Bégard, S., Ando, K., Blum, D., Hamdane, M., and Buée, L. (2006). The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 281, 19296–19304.
- Gamblin, T.C. (2005). Potential structure/function relationships of predicted secondary structural elements of tau. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 140–149.
- Gamblin, T.C., King, M.E., Kuret, J., Berry, R.W., and Binder, L.I. (2000). Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. *Biochemistry* 39, 14203–14210.
- Gerson, J.E., Sengupta, U., Lasagna-Reeves, C.A., Guerrero-Muñoz, M.J., Troncoso, J., and Kayed, R. (2014). Characterization of tau oligomeric seeds in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 73.
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussi re, T., Bouras, C., K vari, E., Perl, D.P., Morrison,

- J.H., Gold, G., and Hof, P.R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60, 1495–1500.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M., and Anderson, P. (2004). Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell* 15, 5383–5398.
- Goedert, M. (2016). The ordered assembly of tau is the gain-of-toxic function that causes human tauopathies. *Alzheimer's Dement.* 12, 1040–1050.
- Goedert, M., and Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225–4230.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., and Crowther, R.A. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 393–399.
- Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A., and Cohen, P. (1997). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 409, 57–62.
- Goldbaum, O., and Richter-Landsberg, C. (2002). Activation of PP2A-like phosphatase and modulation of tau phosphorylation accompany stress-induced apoptosis in cultured oligodendrocytes. *Glia* 40, 271–282.
- Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E., and Hyman, B.T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 41, 17–24.
- Gómez-Ramos, A., Díaz-Nido, J., Smith, M.A., Perry, G., and Avila, J. (2003). Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells. *J. Neurosci. Res.* 71, 863–870.
- Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M.T., and Avila, J. (2008). Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 673–681.
- Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Díaz-Hernández, J.I., Miras-Portugal, M.T., and Avila, J. (2009). Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19, 708–717.
- Gong, C.X., Singh, T.J., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 61, 921–927.
- Gong, C.X., Shaikh, S., Wang, J.Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1995). Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 65, 732–738.
- Goode, B.L., and Feinstein, S.C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J. Cell Biol.* 124, 769–782.
- Gorath, M., Stahnke, T., Mronga, T., Goldbaum, O., and Richter-Landsberg, C. (2001). Developmental changes of tau protein and mRNA in cultured rat brain oligodendrocytes. *Glia*

Gorbalenya, A.E., Koonin, E. V, Donchenko, A.P., and Blinov, V.M. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.* 235, 16–24.

Grant MM. (2010). Identification of SUMOylated proteins in neuroblastoma cells after treatment with hydrogen peroxide or ascorbate. *BMB Rep.* 43, 720-725.

Greenwood, J.A., and Johnson, G. V (1995). Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp. Cell Res.* 220, 332–337.

Gregory, M.A., and Hann, S.R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2423–2435.

Grundke-Iqbal, I., Johnson, A.B., Wisniewski, H.M., Terry, R.D., and Iqbal, K. (1979). Evidence that Alzheimer neurofibrillary tangles originate from neurotubules. *Lancet (London, England)* 1, 578–580.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084–6089.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4913–4917.

Gu, Y., Oyama, F., and Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.* 67, 1235–1244.

Gunawardana, C.G., Mehrabian, M., Wang, X., Mueller, I., Lubambo, I.B., Jonkman, J.E.N., Wang, H., and Schmitt-Ulms, G. (2015). The Human Tau Interactome: Binding to the Ribonucleoproteome, and Impaired Binding of the Proline-to-Leucine Mutant at Position 301 (P301L) to Chaperones and the Proteasome. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 3000–3014.

Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835–840.

Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 509–524.

Haase, C., Stieler, J.T., Arendt, T., and Holzer, M. (2004). Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *J. Neurochem.* 88, 1509–1520.

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

Hanger, D.P., Byers, H.L., Wray, S., Leung, K.-Y., Saxton, M.J., Seereeram, A., Reynolds, C.H., Ward, M.A., and Anderton, B.H. (2007). Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 23645–23654.

Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., and Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-

calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488–491.

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

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.

Hasegawa, M. (2006). Biochemistry and molecular biology of tauopathies. *Neuropathology* 26, 484–490.

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

Hasegawa, M., Smith, M.J., and Goedert, M. (1998). Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett.* 437, 207–210.

Hasegawa, M., Smith, M.J., Iijima, M., Tabira, T., and Goedert, M. (1999). FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10. *FEBS Lett.* 443, 93–96.

Hashimoto, K., Nakagawa, Y., Morikawa, H., Niki, M., Egashira, Y., Hirata, I., Katsu, K., and Akao, Y. (2001). Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines. *Carcinogenesis* 22, 1965–1970.

Hata, H., Mitsui, H., Liu, H., Bai, Y., Denis, C.L., Shimizu, Y., and Sakai, A. (1998). Dhh1p, a putative RNA helicase, associates with the general transcription factors Pop2p and Ccr4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 571–579.

He, H.J., Wang, X.S., Pan, R., Wang, D.L., Liu, M.N., and He, R.Q. (2009). The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biol.* 10, 81.

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

Hikosou, R., Kurabayashi, Y., Doumoto, M., Hoshitoku, K., Mizushima, F., Minoura, K., Tomoo, K., and Ishida, T. (2007). Effect of DNA on filament formation of tau microtubule-binding domain: structural dependence of DNA. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 55, 1030–1033.

Hillebrand, J., Pan, K., Kokaram, A., Barbee, S., Parker, R., and Ramaswami, M. (2010). The Me31B DEAD-Box Helicase Localizes to Postsynaptic Foci and Regulates Expression of a CaMKII Reporter mRNA in Dendrites of *Drosophila* Olfactory Projection Neurons. *Front. Neural Circuits* 4, 121.

Hirling, H., Scheffner, M., Restle, T., and Stahl, H. (1989). RNA helicase activity associated with the human p68 protein. *Nature* 339, 562–564.

Hodgman, T.C. (1988). A new superfamily of replicative proteins. *Nature* 333, 22–23.

Holzer, M., Craxton, M., Jakes, R., Arendt, T., and Goedert, M. (2004). Tau gene (MAPT) sequence variation among primates. *Gene* 341, 313–322.

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

- Hong, X.-P., Peng, C.-X., Wei, W., Tian, Q., Liu, Y.-H., Yao, X.-Q., Zhang, Y., Cao, F.-Y., Wang, Q., and Wang, J.-Z. (2010). Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 20, 1339–1349.
- Hosokawa, M., Arai, T., Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Yamashita, M., Akiyama, H., Hasegawa, M., Wischik, C., Edwards, P., Lai, R., et al. (2012). Methylene Blue Reduced Abnormal Tau Accumulation in P301L Tau Transgenic Mice. *PLoS One* 7, e52389.
- Hua, Q., and He, R. (2003). Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1645, 205–211.
- Hua, Q., and He, R.-Q. (2002). Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept. Lett.* 9, 349–357.
- Hua, Q., He, R.Q., Haque, N., Qu, M.H., del Carmen Alonso, A., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2003). Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 413–421.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16961–16966.
- Hunt, D.L., and Castillo, P.E. (2012). Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 496–508.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 12, 99–110.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–705.
- Iba, M., Guo, J.L., McBride, J.D., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2013). Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J. Neurosci.* 33, 1024–1037.
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., and Ogawara, M. (1986). Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem.* 99, 1807–1810.
- Ikeda, K., Akiyama, H., Kondo, H., Arai, T., Arai, N., and Yagishita, S. (1995). Numerous glial fibrillary tangles in oligodendroglia in cases of subacute sclerosing panencephalitis with neurofibrillary tangles. *Neurosci. Lett.* 194, 133–135.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Lührmann, R., and Achsel, T. (2002). The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA* 8, 1489–1501.
- Iost, I., Dreyfus, M., and Linder, P. (1999). Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J. Biol. Chem.* 274, 17677–17683.
- Iqbal, K., Wiśniewski, H.M., Shelanski, M.L., Brostoff, S., Liwnicz, B.H., and Terry, R.D. (1974). Protein changes in senile dementia.
- Iqbal, K., Zaidi, T., Bancher, C., and Grundke-Iqbal, I. (1994). Alzheimer paired helical filaments. Restoration of the biological activity by dephosphorylation. *FEBS Lett.* 349, 104–108.

- Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M.K., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24, 751–762.
- Ittner, L.M., Fath, T., Ke, Y.D., Bi, M., van Eersel, J., Li, K.M., Gunning, P., and Götz, J. (2008). Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15997–16002.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., et al. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387–397.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T. V (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127.
- Jeganathan, S., von Bergen, M., Brütlich, H., Steinhoff, H.-J., and Mandelkow, E. (2006). Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry* 45, 2283–2293.
- Jicha, G.A., Bowser, R., Kazam, I.G., and Davies, P. (1997). Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J. Neurosci. Res.* 48, 128–132.
- Jin, N., Yin, X., Yu, D., Cao, M., Gong, C.-X., Iqbal, K., Ding, F., Gu, X., and Liu, F. (2015). Truncation and activation of GSK-3 β by calpain I: a molecular mechanism links to tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 5, 8187.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2013). The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev.* 27, 2628–2641.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* 16, 421–433.
- Kadavath, H., Jaremko, M., Jaremko, Ł., Biernat, J., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015). Folding of the Tau Protein on Microtubules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 10347–10351.
- Kahlson, M.A., and Colodner, K.J. (2015). Glial Tau Pathology in Tauopathies: Functional Consequences. *J. Exp. Neurosci.* 9, 43–50.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., and Xu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.* 7, 1511–1522.
- Kamenska, A., Lu, W.-T., Kubacka, D., Broomhead, H., Minshall, N., Bushell, M., and Standart, N. (2014). Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing. *Nucleic Acids Res.* 42, 3298–3313.
- Kamenska, A., Simpson, C., Vindry, C., Broomhead, H., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Lee, B.P., Harries, L.W., Weil, D., and Standart, N. (2016). The DDX6-4E-T interaction mediates translational repression and P-body assembly. *Nucleic Acids Res.* 44, 6318–6334.
- Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett.* 399, 344–349.
- Kanaan, N.M., Morfini, G.A., LaPointe, N.E., Pigino, G.F., Patterson, K.R., Song, Y., Andreadis, A., Fu, Y., Brady, S.T., and Binder, L.I. (2011). Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal

phosphotransferases. *J. Neurosci.* 31, 9858–9868.

Karch, C.M., Jeng, A.T., and Goate, A.M. (2012). Extracellular Tau Levels Are Influenced by Variability in Tau That Is Associated with Tauopathies. *J. Biol. Chem.* 287, 42751–42762.

Karran, E., Mercken, M., and Strooper, B. De (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 698–712.

Kawahara, C., Yokota, S., and Fujita, H. (2014). DDX6 localizes to nuage structures and the annulus of mammalian spermatogenic cells. *Histochem. Cell Biol.* 141, 111–121.

Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169, 871–884.

Kempf, M., Clement, A., Faissner, A., Lee, G., and Brandt, R. (1996). Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J. Neurosci.* 16, 5583–5592.

Kenessey, A., and Yen, S.H. (1993). The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable to that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res.* 629, 40–46.

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

Kimura, T., Whitcomb, D.J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., et al. (2013). Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* 369.

Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., and Hocevar, B.A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 38, 96–109.

Klein, C., Kramer, E.-M., Cardine, A.-M., Schraven, B., Brandt, R., and Trotter, J. (2002). Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J. Neurosci.* 22, 698–707.

Knops, J., Kosik, K.S., Lee, G., Pardee, J.D., Cohen-Gould, L., and McConlogue, L. (1991). Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell Biol.* 114, 725–733.

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

Kong, Q., and Lin, C.-L.G. (2010). Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1817–1829.

Kopeikina, K.J., Carlson, G.A., Pitstick, R., Ludvigson, A.E., Peters, A., Luebke, J.I., Koffie, R.M., Frosch, M.P., Hyman, B.T., and Spire-Jones, T.L. (2011). Tau accumulation causes mitochondrial distribution deficits in neurons in a mouse model of tauopathy and in human Alzheimer's disease brain. *Am. J. Pathol.* 179, 2071–2082.

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

- Kosik, K.S., Joachim, C.L., and Selkoe, D.J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4044–4048.
- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., and Neve, R.L. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389–1397.
- Kramer, S., and Carrington, M. (2014). An AU-rich instability element in the 3'UTR mediates an increase in mRNA stability in response to expression of a dhh1 ATPase mutant. *Transl. (Austin, Tex.)* 2, e28587.
- Krylova, S.M., Musheev, M., Nutiu, R., Li, Y., Lee, G., and Krylov, S.N. (2005). Tau protein binds single-stranded DNA sequence specifically--the proof obtained in vitro with non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. *FEBS Lett.* 579, 1371–1375.
- Ksiezak-Reding, H., Liu, W.K., and Yen, S.H. (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* 597, 209–219.
- Kuzuoğlu-Öztürk, D., Bhandari, D., Huntzinger, E., Fauser, M., Helms, S., and Izaurralde, E. (2016). miRISC and the CCR4-NOT complex silence mRNA targets independently of 43S ribosomal scanning. *EMBO J.* 35, 1186–1203.
- de la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* 24, 192–198.
- Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Guerrero-Muoz, M.J., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2010). Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry* 49, 10039–10041.
- Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Clos, A.L., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol. Neurodegener.* 6, 39.
- Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Sarmiento, J., Troncoso, J., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2012a). Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 26, 1946–1959.
- Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M.J., Kiritoshi, T., Neugebauer, V., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2012b). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci. Rep.* 2, 700.
- Lau, P., Bossers, K., Janky, R., Salta, E., Frigerio, C.S., Barbash, S., Rothman, R., Sierksma, A.S.R., Thathiah, A., Greenberg, D., et al. (2013). Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* 5, 1613–1634.
- Lee, S., and Shea, T.B. (2012). Caspase-mediated truncation of tau potentiates aggregation. *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2012, 731063.
- Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., and Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 3167–3177.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussi re, T., Dupire, M.-J., Delacourte, A., Michalski, J.-C., and Caillet-Boudin, M.-L. (2003). Evidence of a balance between

phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 167–176.

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

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.

Li, B., Chohan, M.O., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2007). Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol.* 113, 501–511.

Li, G., Yin, H., and Kuret, J. (2004). Casein Kinase 1 Delta Phosphorylates Tau and Disrupts Its Binding to Microtubules. *J. Biol. Chem.* 279, 15938–15945.

Li, Z., Wu, J., and Deleo, C.J. (2006). RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life* 58, 581–588.

Linder, P., and Jankowsky, E. (2011). From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 505–516.

Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P.P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337, 121–122.

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

Liu, C., and Götz, J. (2013). Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. *PLoS One* 8, e84849.

Liu, C.W., Lee, G., and Jay, D.G. (1999). Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons. *Cell Motil. Cytoskeleton* 43, 232–242.

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

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

Liu, F., Putnam, A., and Jankowsky, E. (2008). ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20209–20214.

Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, J., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2009). Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1820–1832.

Liu, Q., Smith, M.A., Avilá, J., DeBernardis, J., Kansal, M., Takeda, A., Zhu, X., Nunomura, A., Honda, K., Moreira, P.I., et al. (2005b). Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 746–754.

Llorens-Martin, M., Teixeira, C.M., Fuster-Matanzo, A., Jurado-Arjona, J., Borrell, V., Soriano, E., Avila, J., and Hernández, F. (2012). Tau isoform with three microtubule binding

domains is a marker of new axons generated from the subgranular zone in the hippocampal dentate gyrus: implications for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 29, 921–930.

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

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

Lovell, M.A., and Markesbery, W.R. (2007). Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* 35, 7497–7504.

Lovell, M.A., Xiong, S., Xie, C., Davies, P., and Markesbery, W.R. (2004). Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. *J. Alzheimers. Dis.* 6, 659–71–81.

Lu, J., Miao, J., Su, T., Liu, Y., and He, R. (2013a). Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4102–4116.

Lu, J., Li, T., He, R., Bartlett, P.F., and Götz, J. (2014). Visualizing the microtubule-associated protein tau in the nucleus. *Sci. China Life Sci.* 57, 422–431.

Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., and Yankner, B.A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429, 883–891.

Lu, Y., He, H.-J., Zhou, J., Miao, J.-Y., Lu, J., He, Y.-G., Pan, R., Wei, Y., Liu, Y., and He, R.-Q. (2013b). Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection. *J. Alzheimers. Dis.* 37, 551–563.

Lucas, J.J. (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20, 27–39.

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

Lüth, H.-J., Ogunlade, V., Kuhla, B., Kientsch-Engel, R., Stahl, P., Webster, J., Arendt, T., and Münch, G. (2005). Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb. Cortex* 15, 211–220.

Ma, Q.-L., Zuo, X., Yang, F., Ubeda, O.J., Gant, D.J., Alaverdyan, M., Kiose, N.C., Nazari, S., Chen, P.P., Nothias, F., et al. (2014). Loss of MAP function leads to hippocampal synapse loss and deficits in the Morris Water Maze with aging. *J. Neurosci.* 34, 7124–7136.

Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A.R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T.X., Yamakawa, H., Pao, P.-C., et al. (2015). Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell* 161, 1592–1605.

Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A., and Takashima, A. (2007). Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry* 46, 3856–3861.

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

- Magrassi, L., Leto, K., and Rossi, F. (2013). Lifespan of neurons is uncoupled from organismal lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 4374–4379.
- Mair, W., Muntel, J., Tepper, K., Tang, S., Biernat, J., Seeley, W.W., Kosik, K.S., Mandelkow, E., Steen, H., and Steen, J.A. (2016). FLEXITau: Quantifying Post-translational Modifications of Tau Protein in Vitro and in Human Disease. *Anal. Chem.* *88*, 3704–3714.
- Mansuroglu, Z., Benhelli-Mokrani, H., Marcato, V., Sultan, A., Violet, M., Chauderlier, A., Delattre, L., Loyens, A., Talahari, S., Bégard, S., et al. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Sci. Rep.* *6*, 33047.
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., et al. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* *317*, 1764–1767.
- Mathys, H., Basquin, J., Ozgur, S., Czarnocki-Cieciura, M., Bonneau, F., Aartse, A., Dziembowski, A., Nowotny, M., Conti, E., and Filipowicz, W. (2014). Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression. *Mol. Cell* *54*, 751–765.
- Matrone, M.A., Whipple, R.A., Thompson, K., Cho, E.H., Vitolo, M.I., Balzer, E.M., Yoon, J.R., Ioffe, O.B., Tuttle, K.C., Tan, M., et al. (2010). Metastatic breast tumors express increased tau, which promotes microtentacle formation and the reattachment of detached breast tumor cells. *Oncogene* *29*, 3217–3227.
- Matsui, T., Hogetsu, K., Akao, Y., Tanaka, M., Sato, T., Kumasaka, T., and Tanaka, N. (2004). Crystallization and X-ray analysis of the N-terminal core domain of a tumour-associated human DEAD-box RNA helicase, rck/p54. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* *60*, 156–159.
- Matsui, T., Hogetsu, K., Usukura, J., Sato, T., Kumasaka, T., Akao, Y., and Tanaka, N. (2006). Structural insight of human DEAD-box protein rck/p54 into its substrate recognition with conformational changes. *Genes Cells* *11*, 439–452.
- Matsuo, E.S., Shin, R.W., Billingsley, M.L., Van deVoorde, A., O'Connor, M., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (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.
- McMillan, P., Korvatska, E., Poorkaj, P., Evstafjeva, Z., Robinson, L., Greenup, L., Leverenz, J., Schellenberg, G.D., and D'Souza, I. (2008). Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain. *J. Comp. Neurol.* *511*, 788–803.
- Meier, S., Bell, M., Lyons, D.N., Ingram, A., Chen, J., Gensel, J.C., Zhu, H., Nelson, P.T., and Abisambra, J.F. (2015). Identification of Novel Tau Interactions with Endoplasmic Reticulum Proteins in Alzheimer's Disease Brain. *J. Alzheimers. Dis.* *48*, 687–702.
- Meier, S., Bell, M., Lyons, D.N., Rodriguez-Rivera, J., Ingram, A., Fontaine, S.N., Mechas, E., Chen, J., Wolozin, B., LeVine, H., et al. (2016). Pathological Tau Promotes Neuronal Damage by Impairing Ribosomal Function and Decreasing Protein Synthesis. *J. Neurosci.* *36*, 1001–1007.
- Meijer, H.A., Kong, Y.W., Lu, W.T., Wilczynska, A., Spriggs, R. V., Robinson, S.W., Godfrey, J.D., Willis, A.E., and Bushell, M. (2013). Translational Repression and eIF4A2 Activity Are Critical for MicroRNA-Mediated Gene Regulation. *Science* (80-.). *340*.

- Melov, S., Adlard, P.A., Morten, K., Johnson, F., Golden, T.R., Hinerfeld, D., Schilling, B., Mavros, C., Masters, C.L., Volitakis, I., et al. (2007). Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One* 2, e536.
- Mendez, R., and Richter, J.D. (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 521–529.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., and Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–597.
- Migliaccio, R., Agosta, F., Possin, K.L., Canu, E., Filippi, M., Rabinovici, G.D., Rosen, H.J., Miller, B.L., and Gorno-Tempini, M.L. (2015). Mapping the Progression of Atrophy in Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers. Dis.* 46, 351–364.
- Minshall, N., Thom, G., and Standart, N. (2001). A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *RNA* 7, 1728–1742.
- Minshall N, Reiter MH, Weil D, Standart N. (2007). CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 282: 37389–37401
- Minshall, N., Kress, M., Weil, D., and Standart, N. (2009). Role of p54 RNA helicase activity and its C-terminal domain in translational repression, P-body localization and assembly. *Mol. Biol. Cell* 20, 2464–2472.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242.
- Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., and Boehm, J. (2012). Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 287, 32040–32053.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K., and Ihara, Y. (1995). Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol. Aging* 16, 365–71-80.
- Morsch, R., Simon, W., and Coleman, P.D. (1999). Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 188–197.
- Muddashetty, R.S., Nalavadi, V.C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S.T., and Bassell, G.J. (2011). Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol. Cell* 42, 673–688.
- Mudher, A., Shepherd, D., Newman, T.A., Mildren, P., Jukes, J.P., Squire, A., Mears, A., Drummond, J.A., Berg, S., MacKay, D., et al. (2004). GSK-3 β inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol. Psychiatry* 9, 522–530.
- Muhlrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'–3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* 8, 855–866.
- Mukrasch, M.D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* 7, e34.
- Müller, R., Heinrich, M., Heck, S., Blohm, D., and Richter-Landsberg, C. (1997). Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell*

Tissue Res. 288, 239–249.

Murray, M.E., Kouri, N., Lin, W.-L., Jack, C.R., Dickson, D.W., and Vemuri, P. (2014). Clinicopathologic assessment and imaging of tauopathies in neurodegenerative dementias. *Alzheimers. Res. Ther.* 6, 1.

Murrell, J.R., Koller, D., Foroud, T., Goedert, M., Spillantini, M.G., Edenberg, H.J., Farlow, M.R., and Ghetti, B. (1997). Familial multiple-system tauopathy with presenile dementia is localized to chromosome 17. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 1131–1138.

Naarmann, I.S., Harnisch, C., Müller-Newen, G., Urlaub, H., Ostareck-Lederer, A., and Ostareck, D.H. (2010). DDX6 recruits translational silenced human reticulocyte 15-lipoxygenase mRNA to RNP granules. *RNA* 16, 2189–2204.

Nagao, S.I., Kumamoto, T., Masuda, T., Ueyama, H., Toyoshima, I., and Tsuda, T. (1999). Tau expression in denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 22, 61–70.

Nakamura, A., Amikura, R., Hanyu, K., and Kobayashi, S. (2001). Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis. *Development* 128, 3233–3242.

Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. (2004). *Drosophila* Cup Is an eIF4E Binding Protein that Associates with Bruno and Regulates oskar mRNA Translation in Oogenesis. *Dev. Cell* 6, 69–78.

Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 387, 271–280.

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

Nishimura, T., Padamsi, Z., Fakim, H., Milette, S., Dunham, W.H., Gingras, A.-C., and Fabian, M.R. (2015). The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5' and 3' Termini of Target mRNAs. *Cell Rep.* 11, 1425–1436.

Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., et al. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38, 555–565.

Noble, W., Hanger, D.P., Miller, C.C.J., and Lovestone, S. (2013). The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front. Neurol.* 4, 83.

Nonhoff, U., Ralser, M., Welzel, F., Piccini, I., Balzereit, D., Yaspo, M.-L., Lehrach, H., and Krobitsch, S. (2007). Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol. Biol. Cell* 18, 1385–1396.

Norton, S., Matthews, F.E., Barnes, D.E., Yaffe, K., and Brayne, C. (2014). Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet. Neurol.* 13, 788–794.

Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E.K., Jones, P.K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., et al. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 759–767.

Nunomura, A., Tamaoki, T., Motohashi, N., Nakamura, M., McKeel, D.W., Tabaton, M., Lee,

H.-G., Smith, M.A., Perry, G., and Zhu, X. (2012). The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 233–241.

O’Leary, J.C., Li, Q., Marinec, P., Blair, L.J., Congdon, E.E., Johnson, A.G., Jinwal, U.K., Koren, J., Jones, J.R., Kraft, C., et al. (2010). Phenothiazine-mediated rescue of cognition in tau transgenic mice requires neuroprotection and reduced soluble tau burden. *Mol. Neurodegener.* 5, 45.

O’leary, J.L., Petty, J., Harris, A.B., and Inukai, J. (1968). Supravital Staining of Mammalian Brain with Intraarterial Methylene Blue Followed by Pressurized Oxygen. *Stain Technol.* 43, 197–201.

Olivieri, G., Brack, C., Müller-Spahn, F., Stähelin, H.B., Herrmann, M., Renard, P., Brockhaus, M., and Hock, C. (2000). Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 74, 231–236.

Olivieri, G., Baysang, G., Meier, F., Müller-Spahn, F., Stähelin, H.B., Brockhaus, M., and Brack, C. (2001). N-acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity: effects on beta-amyloid secretion and tau phosphorylation. *J. Neurochem.* 76, 224–233.

Orelle, C., Dalmás, O., Gros, P., Di Pietro, A., and Jault, J.-M. (2003). The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *J. Biol. Chem.* 278, 47002–47008.

Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N., Hentze, M.W., Allen, E., Wang, S., Miller, W., Anthony, D., Merrick, W., Barkoff, A., et al. (2001). Lipoygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3’UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 104, 281–290.

Ostareck, D.H., Naarmann-de Vries, I.S., and Ostareck-Lederer, A. (2014). DDX6 and its orthologs as modulators of cellular and viral RNA expression. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, n/a-n/a.

Oyama, F., Kotliarova, S., Harada, A., Ito, M., Miyazaki, H., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N., and Ihara, Y. (2004). Gem GTPase and tau: morphological changes induced by gem GTPase in cho cells are antagonized by tau. *J. Biol. Chem.* 279, 27272–27277.

Ozgun, S., Basquin, J., Kamenska, A., Filipowicz, W., Standart, N., and Conti, E. (2015). Structure of a Human 4E-T/DDX6/CNOT1 Complex Reveals the Different Interplay of DDX6-Binding Proteins with the CCR4-NOT Complex. *Cell Rep.* 13, 703–711.

Padmaraju, V., Indi, S.S., and Rao, K.S.J. (2010). New evidences on Tau-DNA interactions and relevance to neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 57, 51–57.

Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Navarrete, M., Esteban, J.A., Hernández, F., Ávila, J., and Llorens-Martín, M. (2016). Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis. *EMBO J.* 35, 1417–1436.

Papasozomenos, S.C. (1989). Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type: II. Electron microscopy and pathogenetic implications. Effects of fixation on the morphology of the Alzheimer’s abnormal filaments. *Lab. Invest.* 60, 375–389.

Papasozomenos, S.C. (1996). Heat shock induces rapid dephosphorylation of tau in both female

and male rats followed by hyperphosphorylation only in female rats: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 66, 1140–1149.

Papasozomenos, S.C., and Binder, L.I. (1987). Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil. Cytoskeleton* 8, 210–226.

Patterson, K.R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N.M., Vana, L., Ward, S., Reyes, J.F., Philibert, K., Glucksman, M.J., et al. (2011). Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 286, 23063–23076.

Pause, A., and Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* 11, 2643–2654.

Pause, A., Méthot, N., and Sonenberg, N. (1993). The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6789–6798.

Pedro-Segura, E., Vergara, S. V., Rodríguez-Navarro, S., Parker, R., Thiele, D.J., and Puig, S. (2008). The Cth2 ARE-binding protein recruits the Dhh1 helicase to promote the decay of succinate dehydrogenase SDH4 mRNA in response to iron deficiency. *J. Biol. Chem.* 283, 28527–28535.

Pei, J.J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Bogdanovic, N., Winblad, B., and Cowburn, R.F. (1998). Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res.* 797, 267–277.

Perez, M., Santa-Maria, I., Gomez de Barreda, E., Zhu, X., Cuadros, R., Cabrero, J.R., Sanchez-Madrid, F., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Perry, G., et al. (2009). Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J. Neurochem.* 109, 1756–1766.

Pérez, M., Cuadros, R., Smith, M.A., Perry, G., and Avila, J. (2000). Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett.* 486, 270–274.

Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573–1576.

Planel, E., Miyasaka, T., Launey, T., Chui, D.-H., Tanemura, K., Sato, S., Murayama, O., Ishiguro, K., Tatebayashi, Y., and Takashima, A. (2004). Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24, 2401–2411.

Planel, E., Richter, K.E.G., Nolan, C.E., Finley, J.E., Liu, L., Wen, Y., Krishnamurthy, P., Herman, M., Wang, L., Schachter, J.B., et al. (2007). Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J. Neurosci.* 27, 3090–3097.

Pooler, A.M., Usardi, A., Evans, C.J., Philpott, K.L., Noble, W., and Hanger, D.P. (2012). Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiol. Aging* 33, 431.e27–431.e38.

Pooler, A.M., Phillips, E.C., Lau, D.H.W., Noble, W., and Hanger, D.P. (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep.* 14, 389–394.

- Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M., and Schellenberg, G.D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* 43, 815–825.
- Poorkaj, P., Kas, A., D'Souza, I., Zhou, Y., Pham, Q., Stone, M., Olson, M. V., and Schellenberg, G.D. (2001). A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau. *Mamm. Genome* 12, 700–712.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144.
- Qi, H., Cantrelle, F.-X., Benhelli-Mokrani, H., Smet-Nocca, C., Buée, L., Lippens, G., Bonnefoy, E., Galas, M.-C., and Landrieu, I. (2015). Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of interaction of Tau with DNA and its regulation by phosphorylation. *Biochemistry* 54, 1525–1533.
- Qi, M.-Y., Wang, Z.-Z., Zhang, Z., Shao, Q., Zeng, A., Li, X.-Q., Li, W.-Q., Wang, C., Tian, F.-J., Li, Q., et al. (2012). AU-rich-element-dependent translation repression requires the cooperation of tristetraprolin and RCK/P54. *Mol. Cell. Biol.* 32, 913–928.
- Qi, Z., Tang, D., Matsuura, I., Lee, K.Y., Zhu, X., Huang, Q.Q., and Wang, J.H. Regulatory properties of neuronal cdc2-like kinase. *Mol. Cell. Biochem.* 149–150, 35–39.
- Qu, M., Li, H., Tian, R., Nie, C., Liu, Y., Han, B., and He, R. (2004). Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport* 15, 2723–2727.
- Reed, L.A., Wszolek, Z.K., and Hutton, M. Phenotypic correlations in FTDP-17. *Neurobiol. Aging* 22, 89–107.
- Regan, P., Piers, T., Yi, J.-H., Kim, D.-H., Huh, S., Park, S.J., Ryu, J.H., Whitcomb, D.J., and Cho, K. (2015). Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *J. Neurosci.* 35, 4804–4812.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11, 1640–1647.
- Reijns, M.A.M., Alexander, R.D., Spiller, M.P., and Beggs, J.D. (2008). A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *J. Cell Sci.* 121, 2463–2472.
- Reynolds, C.H., Garwood, C.J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P.W., Varndell, I.M., et al. (2008a). Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J. Biol. Chem.* 283, 18177–18186.
- Reynolds, M.R., Berry, R.W., and Binder, L.I. (2005). Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 44, 1690–1700.
- Ricci, E.P., Limousin, T., Soto-Rifo, R., Rubilar, P.S., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2013). miRNA repression of translation in vitro takes place during 43S ribosomal scanning. *Nucleic Acids Res.* 41, 586–598.
- Rogers, G.W., Komar, A.A., and Merrick, W.C. (2002). eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 307–331.

- Rossi, G., Dalprà, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F.L., Catania, M., Mangieri, M., Giaccone, G., Croci, D., and Tagliavini, F. (2008). A new function of microtubule-associated protein tau: Involvement in chromosome stability. *Cell Cycle* 7, 1788–1794.
- Rossi, G., Conconi, D., Panzeri, E., Redaelli, S., Piccoli, E., Paoletta, L., Dalprà, L., and Tagliavini, F. (2013). Mutations in MAPT gene cause chromosome instability and introduce copy number variations widely in the genome. *J. Alzheimers. Dis.* 33, 969–982.
- Rouya, C., Siddiqui, N., Morita, M., Duchaine, T.F., Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2014). Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA* 20, 1398–1409.
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., and Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1134–1144.
- Ruben, G.C., Novak, M., Edwards, P.C., and Iqbal, K. (1995). Alzheimer paired helical filaments, untreated and pronase digested, studied by vertical platinum-carbon replication and high resolution transmission electron microscopy. *Brain Res.* 675, 1–12.
- Ruiz-Ramos, R., Lopez-Carrillo, L., Rios-Perez, A.D., De Vizcaya-Ruiz, A., and Cebrian, M.E. (2009). Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kappaB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Mutat. Res.* 674, 109–115.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spire, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., et al. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476–481.
- Sapir, T., Frotscher, M., Levy, T., Mandelkow, E.-M., and Reiner, O. (2012). Tau's role in the developing brain: implications for intellectual disability. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1681–1692.
- Satizabal, C.L., Beiser, A.S., Chouraki, V., Chêne, G., Dufouil, C., and Seshadri, S. (2016). Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* 374, 523–532.
- Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M., Wiltzius, J.J.W., McFarlane, H.T., et al. (2007). Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447, 453–457.
- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J.-P., Hamdane, M., and Buée, L. (2006). Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am. J. Pathol.* 169, 599–616.
- Schirmer, R.H., Adler, H., Pickhardt, M., and Mandelkow, E. (2011). "Lest we forget you--methylene blue...". *Neurobiol. Aging* 32, 2325.e7-16.
- Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.M. (1999). Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 38, 3549–3558.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342.

- Schweers, O., Schönbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., and Mandelkow, E. (1994). Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J. Biol. Chem.* 269, 24290–24297.
- Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S., and Yokoyama, S. (2006). Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa. *Cell* 125, 287–300.
- Sennvik, K., Boekhoorn, K., Lasrado, R., Terwel, D., Verhaeghe, S., Korr, H., Schmitz, C., Tomiyama, T., Mori, H., Krugers, H., et al. (2007). Tau-4R suppresses proliferation and promotes neuronal differentiation in the hippocampus of tau knockin/knockout mice. *FASEB J.* 21, 2149–2161.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics* 5, 207–224.
- Shan, X., and Lin, C.-L.G. (2006). Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27, 657–662.
- Shan, X., Tashiro, H., and Lin, C.G. (2003). The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 23, 4913–4921.
- Sharif, H., Ozgur, S., Sharma, K., Basquin, C., Urlaub, H., and Conti, E. (2013). Structural analysis of the yeast Dhh1-Pat1 complex reveals how Dhh1 engages Pat1, Edc3 and RNA in mutually exclusive interactions. *Nucleic Acids Res.* 41, 8377–8390.
- Shea, T.B., and Cressman, C.M. (1998). A 26-30 kDa developmentally-regulated tau isoform localized within nuclei of mitotic human neuroblastoma cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 41–48.
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808.
- Shi, H., Cordin, O., Minder, C.M., Linder, P., and Xu, R.-M. (2004). Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17628–17633.
- Sigala, J., Jumeau, F., Caillet-Boudin, M.-L., Sergeant, N., Ballot, C., Rigot, J.-M., Marcelli, F., Tardivel, M., Buée, L., and Mitchell, V. Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis. *Asian J. Androl.* 16, 927–928.
- Simms, C.L., and Zaher, H.S. (2016). Quality control of chemically damaged RNA. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3639–3653.
- Simón, D., García-García, E., Gómez-Ramos, A., Falcón-Pérez, J.M., Díaz-Hernández, M., Hernández, F., and Avila, J. (2012). Tau Overexpression Results in Its Secretion via Membrane Vesicles. *Neurodegener. Dis.* 10, 73–75.
- Sjöberg, M.K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B., and Bonnefoy, E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J. Cell Sci.* 119, 2025–2034.
- Smillie, D.A., and Sommerville, J. (2002). RNA helicase p54 (DDX6) is a shuttling protein involved in nuclear assembly of stored mRNP particles. *J. Cell Sci.* 115, 395–407.
- Smith, C.J., Anderton, B.H., Davis, D.R., and Gallo, J.-M. (1995). Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. *FEBS Lett.* 375, 243–248.

Smith, P.Y., Hernandez-Rapp, J., Jolivet, F., Lecours, C., Bisht, K., Goupil, C., Dorval, V., Parsi, S., Morin, F., Planel, E., et al. (2015). miR-132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo. *Hum. Mol. Genet.* 24, 6721–6735.

Song, J., Cho, K.J., Oh, Y., and Lee, J.E. (2015). Let7a involves in neural stem cell differentiation relating with TLX level.

Soto-Rojas, L.O., Cruz-López, F. de la, Ontiveros-Torres, M.A., Viramontes-Pintos, A., Cárdenas-Aguayo, M. del C., Meraz-Ríos, M.A., Salinas-Lara, C., Florán-Garduño, B., and Luna-Muñoz, J. (2015). Neuroinflammation and Alteration of the Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. In *Alzheimer's Disease - Challenges for the Future*, (InTech), p.

Souquere, S., Mollet, S., Kress, M., Dautry, F., Pierron, G., and Weil, D. (2009). Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J. Cell Sci.* 122.

Souter, S., and Lee, G. (2009). Microtubule-associated protein tau in human prostate cancer cells: isoforms, phosphorylation, and interactions. *J. Cell. Biochem.* 108, 555–564.

Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7737–7741.

Stack, C., Jainuddin, S., Elipenahli, C., Gerges, M., Starkova, N., Starkov, A.A., Jové, M., Portero-Otin, M., Launay, N., Pujol, A., et al. (2014). Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3716–3732.

Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J. Cell Biol.* 156, 1051–1063.

Stanford, P.M., Shepherd, C.E., Halliday, G.M., Brooks, W.S., Schofield, P.W., Brodaty, H., Martins, R.N., Kwok, J.B.J., and Schofield, P.R. (2003). Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain* 126, 814–826.

Su, B., Wang, X., Lee, H., Tabaton, M., Perry, G., Smith, M.A., and Zhu, X. (2010). Chronic oxidative stress causes increased tau phosphorylation in M17 neuroblastoma cells.

Subramanya, H.S., Bird, L.E., Brannigan, J.A., and Wigley, D.B. (1996). Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature* 384, 379–383.

Sudhakaran, I.P., Hillebrand, J., Dervan, A., Das, S., Holohan, E.E., Hülsmeier, J., Sarov, M., Parker, R., VijayRaghavan, K., and Ramaswami, M. (2014). FMRP and Ataxin-2 function together in long-term olfactory habituation and neuronal translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E99–E108.

Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* 286, 4566–4575.

Sundaram, J.R., Poore, C.P., Sulaimi, N.H. Bin, Pareek, T., Asad, A.B.M.A., Rajkumar, R., Cheong, W.F., Wenk, M.R., Dawe, G.S., Chuang, K.-H., et al. (2013). Specific inhibition of p25/Cdk5 activity by the Cdk5 inhibitory peptide reduces neurodegeneration in vivo. *J. Neurosci.* 33, 334–343.

Swain, U., and Subba Rao, K. (2011). Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. *Mech. Ageing Dev.*

132, 374–381.

Szendrei, G.I., Lee, V.M., and Otvos, L. (1993). Recognition of the minimal epitope of monoclonal antibody Tau-1 depends upon the presence of a phosphate group but not its location. *J. Neurosci. Res.* 34, 243–249.

T. Chris Gamblin, *,‡, Michelle E. King, ‡, Jeff Kuret, §, Robert W. Berry, ‡ and, and Binder‡, L.I. (2000). Oxidative Regulation of Fatty Acid-Induced Tau Polymerization†.

Takei, Y., Teng, J., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000). Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J. Cell Biol.* 150, 989–1000.

Takeuchi, H., Iba, M., Inoue, H., Higuchi, M., Takao, K., Tsukita, K., Karatsu, Y., Iwamoto, Y., Miyakawa, T., Suhara, T., et al. (2011). P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. *PLoS One* 6, e21050.

Tandon, A., Yu, H., Wang, L., Rogaeva, E., Sato, C., Chishti, M.A., Kawarai, T., Hasegawa, H., Chen, F., Davies, P., et al. (2003). Brain levels of CDK5 activator p25 are not increased in Alzheimer's or other neurodegenerative diseases with neurofibrillary tangles. *J. Neurochem.* 86, 572–581.

Tang, Z., Ioja, E., Bereczki, E., Hultenby, K., Li, C., Guan, Z., Winblad, B., and Pei, J.-J. (2015). mTor mediates tau localization and secretion: Implication for Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853, 1646–1657.

Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., Goedert, M., and Hasegawa, M. (2005). Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J. Biol. Chem.* 280, 7614–7623.

Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., and Linder, P. (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell* 11, 127–138.

Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., and Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11, 371–382.

Tenreiro, S., Eckermann, K., and Outeiro, T.F. (2014). Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Front. Mol. Neurosci.* 7.

Tepper, K., Biernat, J., Kumar, S., Wegmann, S., Timm, T., Hübschmann, S., Redecke, L., Mandelkow, E.-M., Müller, D.J., and Mandelkow, E. (2014). Oligomer formation of tau protein hyperphosphorylated in cells. *J. Biol. Chem.* 289, 34389–34407.

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

Tharun, S. Lsm1-7-Pat1 complex: a link between 3' and 5'-ends in mRNA decay? *RNA Biol.* 6, 228–232.

Thurston, V.C., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1996). Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma* 105, 20–30.

Thurston, V.C., Pena, P., Pestell, R., and Binder, L.I. (1997a). Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38, 100–110.

- Thurston, V.C., Pena, P., Pestell, R., and Binder, L.I. (1997b). Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38, 100–110.
- Tian, H., Davidowitz, E., Lopez, P., Emadi, S., Moe, J., and Sierks, M. (2013). Trimeric tau is toxic to human neuronal cells at low nanomolar concentrations. *Int. J. Cell Biol.* 2013, 260787.
- Tolnay, M., and Probst, A. (2003). The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies. *IUBMB Life* 55, 299–305.
- Tracy, T.E., Sohn, P.D., Minami, S.S., Wang, C., Min, S.-W., Li, Y., Zhou, Y., Le, D., Lo, I., Ponnusamy, R., et al. (2016). Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss. *Neuron* 90, 245–260.
- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1995). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell* 6, 1887–1902.
- Tritschler, F., Braun, J.E., Eulalio, A., Truffault, V., Izaurralde, E., Weichenrieder, O., Albrecht, M., Lengauer, T., Anantharaman, V., Aravind, L., et al. (2009). Structural basis for the mutually exclusive anchoring of P body components EDC3 and Tral to the DEAD box protein DDX6/Me31B. *Mol. Cell* 33, 661–668.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D., and Parker, R. (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21, 1427–1436.
- Usardi, A., Pooler, A.M., Seereeram, A., Reynolds, C.H., Derkinderen, P., Anderton, B., Hanger, D.P., Noble, W., and Williamson, R. (2011). Tyrosine phosphorylation of tau regulates its interactions with Fyn SH2 domains, but not SH3 domains, altering the cellular localization of tau. *FEBS J.* 278, 2927–2937.
- Utton, M.A., Noble, W.J., Hill, J.E., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2005). Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *J. Cell Sci.* 118, 4645–4654.
- Van der Jeugd, A., Hochgräfe, K., Ahmed, T., Decker, J.M., Sydow, A., Hofmann, A., Wu, D., Messing, L., Balschun, D., D’Hooge, R., et al. (2012). Cognitive defects are reversible in inducible mice expressing pro-aggregant full-length human Tau. *Acta Neuropathol.* 123, 787–805.
- Vanderweyde, T., Yu, H., Varnum, M., Liu-Yesucevitz, L., Citro, A., Ikezu, T., Duff, K., and Wolozin, B. (2012). Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies. *J. Neurosci.* 32, 8270–8283.
- Vanderweyde, T., Youmans, K., Liu-Yesucevitz, L., and Wolozin, B. (2013). Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review. *Gerontology* 59, 524–533.
- Vanderweyde, T., Apicco, D.J., Youmans-Kidder, K., Ash, P.E.A., Cook, C., Lummertz da Rocha, E., Jansen-West, K., Frame, A.A., Citro, A., Leszyk, J.D., et al. (2016). Interaction of tau with the RNA-Binding Protein TIA1 Regulates tau Pathophysiology and Toxicity. *Cell Rep.* 15, 1455–1466.
- Van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Séraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic

structures. *EMBO J.* 21, 6915–6924.

Vanhelmont, T., Vandebroek, T., De Vos, A., Terwel, D., Lemaire, K., Anandhakumar, J., Franssens, V., Swinnen, E., Van Leuven, F., and Winderickx, J. (2010). Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. *FEMS Yeast Res.* 10, 992–1005.

Vanier, M.T., Neuville, P., Michalik, L., and Launay, J.F. (1998). Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J. Cell Sci.* 1419–1432.

Vasudevaraju, P., Guerrero, E., Hegde, M.L., Collen, T.B., Britton, G.B., and Rao, K.S. (2012). New evidence on α -synuclein and Tau binding to conformation and sequence specific GC* rich DNA: Relevance to neurological disorders. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4, 112–117.

Vershinin, M., Carter, B.C., Razafsky, D.S., King, S.J., and Gross, S.P. (2007). Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 87–92.

Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nesslany, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., et al. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 84.

Von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5129–5134.

Von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2001). Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J. Biol. Chem.* 276, 48165–48174.

Von Bergen, M., Barghorn, S., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (2005). Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 158–166.

Wahle, E., and Winkler, G.S. RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 561–570.

Wang, Z., and Kiledjian, M. (2001). Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107, 751–762.

Wang, J., Markesbery, W.R., and Lovell, M.A. (2006a). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *J. Neurochem.* 96, 825–832.

Wang, J.Z., Gong, C.X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1995). Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J. Biol. Chem.* 270, 4854–4860.

Wang, X., Wang, D., Zhao, J., Qu, M., Zhou, X., He, H., and He, R. (2006b). The proline-rich domain and the microtubule binding domain of protein tau acting as RNA binding domains. *Protein Pept. Lett.* 13, 679–685.

Wang, Y., Loomis, P.A., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1993). A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J. Cell Biol.* 121, 257–267.

Wang, Y., Zhang, Y., Hu, W., Xie, S., Gong, C.-X., Iqbal, K., Liu, F., Levene, P.A., Beatty, W.A., Fischer, E.H., et al. (2015). Rapid alteration of protein phosphorylation during

- postmortem: implication in the study of protein phosphorylation. *Sci. Rep.* 5, 15709.
- Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A., and Kiledjian, M. (2002). The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12663–12668.
- Ward, S.M., Himmelstein, D.S., Lancia, J.K., Fu, Y., Patterson, K.R., and Binder, L.I. (2013). TOC1: characterization of a selective oligomeric tau antibody. *J. Alzheimers. Dis.* 37, 593–602.
- Wegmann, S., Maury, E.A., Kirk, M.J., Saqran, L., Roe, A., DeVos, S.L., Nicholls, S., Fan, Z., Takeda, S., Cagsal-Getkin, O., et al. (2015). Removing endogenous tau does not prevent tau propagation yet reduces its neurotoxicity. *EMBO J.* 34, 3028–3041.
- Wei, M.L., and Andreadis, A. (1998). Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.* 70, 1346–1356.
- Wei, Y., Qu, M.-H., Wang, X.-S., Chen, L., Wang, D.-L., Liu, Y., Hua, Q., and He, R.-Q. (2008). Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PLoS One* 3, e2600.
- Weingarten, M., and gg, ff A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* 118, 981–992.
- Wilhelmsen, K.C., Lynch, T., Pavlou, E., Higgins, M., and Nygaard, T.G. (1994). Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 1159–1165.
- Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., and Crowther, R.A. (1988). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4884–4888.
- Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y., Roth, M., and Harrington, C.R. (1996). Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11213–11218.
- Wiseman, H., and Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 17–29.
- Wittmann, C.W., Wszolek, M.F., Shulman, J.M., Salvaterra, P.M., Lewis, J., Hutton, M., and Feany, M.B. (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293, 711–714.
- Wong, L.C., Costa, A., McLeod, I., Sarkeshik, A., Yates, J., Kyin, S., Perlman, D., Schedl, P., and Schedl, P. (2011). The functioning of the *Drosophila* CPEB protein Orb is regulated by phosphorylation and requires casein kinase 2 activity. *PLoS One* 6, e24355.
- Wu, X., and Brewer, G. (2012). The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene* 500, 10–21.
- Wu, J.W., Hussaini, S.A., Bastille, I.M., Rodriguez, G.A., Mrejeru, A., Rilett, K., Sanders, D.W., Cook, C., Fu, H., Boonen, R.A.C.M., et al. (2016). Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nat. Neurosci.* 19, 1085–1092.
- Wu, L., Wells, D., Tay, J., Mendis, D., Abbott, M.A., Barnitt, A., Quinlan, E., Heynen, A.,

Fallon, J.R., and Richter, J.D. (1998). CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* 21, 1129–1139.

Yamada, K., Cirrito, J.R., Stewart, F.R., Jiang, H., Finn, M.B., Holmes, B.B., Binder, L.I., Mandelkow, E.-M., Diamond, M.I., Lee, V.M.-Y., et al. (2011). In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *J. Neurosci.* 31, 13110–13117.

Yamada, K., Holth, J.K., Liao, F., Stewart, F.R., Mahan, T.E., Jiang, H., Cirrito, J.R., Patel, T.K., Hochgräfe, K., Mandelkow, E.-M., et al. (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *J. Exp. Med.* 211, 387–393.

Yamaguchi, H., Ishiguro, K., Uchida, T., Takashima, A., Lemere, C.A., and Imahori, K. (1996). Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol.* 92, 232–241.

Yamamoto, H., Hasegawa, M., Ono, T., Tashima, K., Ihara, Y., and Miyamoto, E. (1995). Dephosphorylation of fetal-tau and paired helical filaments-tau by protein phosphatases 1 and 2A and calcineurin. *J. Biochem.* 118, 1224–1231.

Yamashita, A., Chang, T.-C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1054–1063.

Yang, Z. (2004). GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J. Cell Sci.* 117, 5567–5578.

Yang, W.-H., Yu, J.H., Gulick, T., Bloch, K.D., and Bloch, D.B. (2006). RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA* 12, 547–554.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337–351.

Yoshizaki, C., Tsukane, M., and Yamauchi, T. (2004). Overexpression of tau leads to the stimulation of neurite outgrowth, the activation of caspase 3 activity, and accumulation and phosphorylation of tau in neuroblastoma cells on cAMP treatment. *Neurosci. Res.* 49, 363–371.

Yu, J.-Z., and Rasenick, M.M. (2006). Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *FASEB J.* 20, 1452–1461.

Zhang, B., Maiti, A., Shively, S., Lakhani, F., McDonald-Jones, G., Bruce, J., Lee, E.B., Xie, S.X., Joyce, S., Li, C., et al. (2005). Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 227–231.

Zhang Y., Man V.H., Roland C., Sagui C. (2016). Amyloid properties of asparagine and glutamine in prion-like proteins. *ACS Chem Neurosci.* 7, 576-87.

Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., Zhu, W., He, X., and Shyu, A.-B. (2008). Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 182, 89–101.

Annexes

Contributions scientifiques :

In Vivo Hyperthermic Stress Model: An Easy Tool to Study the Effects of Oxidative Stress on Neuronal Tau Functionality in Mouse Brain. Chauderlier A, Delattre L, Buée L, Galas MC. Methods Mol Biol. 2017

Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. Mansuroglu Z, Benhelli-Mokrani H, Marcato V, Sultan A, Violet M, Chauderlier A, Delattre L, Loyens A, Talahari S, Bégard S, Nessler F, Colin M, Souès S, Lefebvre B, Buée L, Galas MC, Bonnefoy E. Sci Rep. 2016

Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo. Chauderlier A*, Violet M*, Delattre L*, Tardivel M, Sendid Chouala M, Sultan A, Marciniak E, Humez S, Binder L, Kaye R, Lefebvre B, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC. Neurobiol. Dis. 2015

A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A, Chauderlier A, Caillierez R, Talahari S, Nessler F, Lefebvre B, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC. Front Cell Neurosci. 2014