

2m11.3224.6

Université de Montréal

**Rôle de la phosphorylation dans la distribution  
cellulaire de la protéine tau**

par  
Mylène Desjardins

Département de pathologie et biologie cellulaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)  
en Pathologie et biologie cellulaires  
option Système nerveux

Janvier, 2005



© Mylène Desjardins, 2005

W

4

U58

2005

V.008

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Rôle de la phosphorylation dans la distribution  
cellulaire de la protéine tau**

présenté par :

Mylène Desjardins

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Laurent Descarries  
président-rapporteur

Dr Nicole Leclerc  
directeur de recherche

Dr Adriana Di Polo  
membre du jury

## RÉSUMÉ

La protéine tau est une protéine soluble normalement enrichie au niveau de l'axone des neurones adultes. Cependant, elle devient hyperphosphorylée et s'accumule sous forme de filaments insolubles dans le corps cellulaire et les dendrites au cours des tauopathies. L'objectif de la présente étude était donc de vérifier si l'hyperphosphorylation de tau est responsable de son accumulation dans le compartiment somato-dendritique des neurones. Pour ce faire, plusieurs acides aminés de la protéine tau humaine, reconnus pour être phosphorylés dans les tauopathies, ont été mutés d'une part en glutamate, pour mimer la phosphorylation, et d'autre part en alanine, une forme non phosphorylable. Les protéines tau normales et mutantes, fusionnées en N-terminal à la GFP, ont ensuite été exprimées dans des cultures primaires de neurones de l'hippocampe de rats. Une analyse immunocytochimique a d'abord révélé un enrichissement des protéines tau endogènes dans l'axone des neurones au jour 7 de leur développement. Cependant, les protéines tau exogènes normales et mutantes étaient distribuées uniformément dans tous les compartiments cellulaires. Cette distribution inadéquate ne semble pas être reliée à l'isoforme ou à l'espèce de la protéine tau employée, ni à la présence ou à la position du « tag » GFP sur la protéine tau. Elle pourrait cependant être due à un temps d'expression insuffisamment long et à l'absence de la région 3' non traduite (3'UTR), qui contient un signal de ciblage axonal.

**Mots clés :** neurone, polarité neuronale, MAP2, tau, tauopathies, neurodégénérescence, enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs), paires de filaments hélicoïdaux (PHFs), mutants, phosphorylation

## SUMMARY

In normal adult brain, tau is a soluble protein enriched in the axonal compartment. In neurodegenerative diseases termed tauopathies, tau becomes hyperphosphorylated and accumulates as insoluble filaments in the somato-dendritic compartment. The goal of the present study was to verify whether hyperphosphorylation of tau protein is the main cause of its accumulation in the somato-dendritic compartment in degenerative neurons. For this purpose, we have generated different mutated forms of tau that mimic phosphorylation (glutamate) or non-phosphorylation (alanine) at sites known to be phosphorylated in tauopathies. These mutants, fused to a GFP tag in their N-terminal, were expressed in rat primary hippocampal neurons. At first, immunofluorescence study has revealed that endogenous tau protein was enriched in the axon of hippocampal neurons after 7 days in culture. However, exogenous tau proteins (mutant or normal) were present in all cellular compartments. This unexpected distribution of overexpressed tau does not seem to be dependant on tau isoforms, tau origins (rat vs human) and on the presence of a tag in N-terminal or C-terminal. In fact, this distribution may be due to an insufficient time of expression and to the absence of the 3'UTR that contains an axonal targeting signal.

**Keywords :** neuron, neuronal polarity, MAP2, tau, tauopathies, neurodegeneration, neurofibrillary tangles (NFTs), paired helical filaments (PHFs), mutants, phosphorylation

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
SUMMARY .....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES .....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xi
REMERCIEMENTS .....	xv
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. LE NEURONE .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Structure du système nerveux et du neurone .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Le cytosquelette neuronal.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2.1. Les microtubules.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2.2. Les neurofilaments .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2.3. Les microfilaments d'actine .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. La polarité neuronale.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3.1. Établissement de la polarité.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3.2. Niveau morphologique.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3.3. Niveau cytosquelettique .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.3.4. Niveau fonctionnel.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.3.5. Niveau biochimique .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.3.6. Mécanismes d'établissement et de maintien de la polarité.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. LES MAPs.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1. La MAP1 .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.2. La MAP2 .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. LA PROTÉINE TAU.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.1. Structure génique et protéique .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2. Localisation de tau .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.2.1. Mécanismes impliqués dans la localisation axonale de tau .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.3. Fonctions de tau .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.3.1. Domaine de liaison aux microtubules .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.3.2. Domaine de projection.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.3.3. Rôle de tau dans la formation de l'axone .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4. TAU ET NEURODÉGÉNÉRESCENCE .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.1. Tauopathies et enchevêtrements neurofibrillaires .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.2. Mutations de tau.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.3. Modèles animaux .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.3.1. Eucaryotes inférieurs.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.3.2. Eucaryotes supérieurs.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5. LA PHOSPHORYLATION DE TAU .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5.1. Sites de phosphorylation.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5.2. Au niveau du développement .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5.3. Au niveau pathologique.....</b>	<b>32</b>

1.5.3.1. <i>Conséquences de l'hyperphosphorylation</i> .....	32
1.5.3.2. <i>Kinases et phosphatases impliquées</i> .....	34
1.6. OBJECTIF DE L'ÉTUDE .....	36
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	40
2.1. PLASMIDES D'EXPRESSION .....	40
2.2. MUTAGENÈSE .....	41
2.3. CULTURES CELLULAIRES .....	41
2.4. TRANSFECTIONS .....	42
2.5. IMMUNOBUVARDAGE.....	42
2.6. IMMUNOCYTOCHIMIE.....	43
<b>3. RÉSULTATS</b> .....	45
3.1. PRODUCTION DES MUTANTS.....	45
3.1.1. Stratégie « Altered Sites® II Mammalian Mutagenesis System » de Promega .....	45
3.1.2. Stratégie impliquant des étapes de PCR et de sous-clonage .....	45
3.1.3. Stratégie « QuikChange® XL site-directed mutagenesis kit » de Stratagene ...	52
3.1.4. Expression des mutants dans les cellules Hela .....	60
3.2. DISTRIBUTION DE LA PROTÉINE TAU ENDOGÈNE.....	63
3.2.1. Enrichissement de tau endogène dans l'axone .....	63
3.2.2. Enrichissement de tau déphosphorylée dans l'axone.....	63
3.2.3. Distribution de tau phosphorylée dans tous les compartiments cellulaires.....	66
3.3. DISTRIBUTION DE LA PROTÉINE TAU EXOGÈNE.....	71
3.3.1. Distribution uniforme de GFP-Tau4R dans tous les compartiments cellulaires .....	71
3.3.2. Distribution uniforme de GFP-Tau4R déphosphorylée dans tous les compartiments cellulaires.....	72
3.3.3. Distribution de GFP-Tau3R identique à celle de GFP-Tau4R .....	75
3.3.4. Distribution de GFP-Tau3R phosphorylée dans le compartiment somato- dendritique.....	78
3.4. CAUSES POSSIBLES DE LA DISTRIBUTION INADÉQUATE DE TAU EXOGENÈ : HYPOTHÈSES VÉRIFIÉES .....	81
3.4.1. Effet de la position du « tag » GFP : 5' vs 3' .....	81
3.4.2. Effet de la longueur du « tag » : GFP vs Flag .....	84
3.4.3. Effet de l'espèce de la protéine : humain vs rat .....	87
3.4.4. Effet du temps d'expression de la protéine : apparition d'un gradient proximo-distal de tau dans l'axone à 48 heures .....	87
3.5. DISTRIBUTION DES PROTÉINES TAU MUTANTES.....	90
3.5.1. Distribution uniforme des mutants de tau dans tous les compartiments cellulaires .....	90
3.5.2. Présence du gradient proximo-distal dans l'axone à 48 heures d'expression ..	93



<b>4. DISCUSSION</b> .....	96
<b>4.1. LES PROTÉINES TAU MUTANTES</b> .....	96
4.1.1. Stratégie de « pseudohyperphosphorylation » de tau.....	96
4.1.2. Expression des mutants de tau .....	96
4.1.3. Distribution uniforme des mutants de tau dans tous les compartiments neuronaux .....	97
<b>4.2. LES PROTÉINES TAU EXOGÈNES NORMALES</b> .....	98
4.2.1. Distribution inadéquate : localisation uniforme dans tous les compartiments neuronaux .....	98
<b>4.3. CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES</b> .....	98
4.3.1. Distribution de l'isoforme exogène fœtale de tau humaine identique à celle de l'isoforme adulte .....	98
4.3.2. Aucun effet de la position ni de la présence du « tag » GFP sur la distribution de la protéine tau exogène humaine.....	99
4.3.3. Distribution de l'isoforme adulte de tau exogène de rat identique à celle de l'isoforme humaine .....	99
4.3.4. Augmentation de la durée d'expression de tau exogène et apparition d'un gradient proximo-distal dans l'axone .....	100
4.3.5. Surexpression de la protéine tau .....	101
4.3.6. Utilisation de la séquence 3'UTR de tau pour obtenir une localisation axonale .....	102
<b>4.4. CONSÉQUENCE DE LA SUREXPRESSION DE TAU</b> .....	102
4.4.1. Perte de MAP2 dans le neurone.....	102
<b>4.5. VALIDITÉ DU MODÈLE CELLULAIRE EN CONDITIONS NORMALES</b> .....	104
4.5.1. Distribution de la protéine tau endogène totale : enrichissement dans l'axone.....	104
4.5.2. Distribution de la protéine tau endogène déphosphorylée : enrichissement dans l'axone.....	105
4.5.3. Distribution de la protéine tau endogène phosphorylée : quasi uniforme dans tous les compartiments neuronaux.....	107
<b>4.6. DIFFÉRENTES POPULATIONS DE TAU PHOSPHORYLÉE</b> .....	109
4.6.1. Population de tau normale .....	109
4.6.2. Population de tau pathologique.....	110
<b>4.7. VALIDITÉ DU MODÈLE CELLULAIRE EN CONDITIONS DE   SUREXPRESSION DE LA PROTÉINE TAU NORMALE</b> .....	111
4.7.1. Accumulation des protéines tau phosphorylées dans le compartiment somato-dendritique .....	111
<b>4.8. CONCLUSION</b> .....	113
<b>5. LISTE DE RÉFÉRENCES</b> .....	114

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I.</b> Tauopathies neurodégénératives. ....	21
<b>Tableau II.</b> Souris transgéniques exprimant des isoformes normales de la protéine tau humaine. ....	27
<b>Tableau III.</b> Souris transgéniques exprimant des isoformes mutantes de la protéine tau humaine. ....	28
<b>Tableau IV.</b> Sites phosphorylés de la protéine tau humaine et kinases impliquées. ....	30
<b>Tableau V.</b> Caractéristiques des différentes constructions d'ADN plasmidique de tau utilisées au cours de cette étude. ....	40

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Stades de développement des neurones de l'hippocampe en culture. ....	6
<b>Figure 2.</b> Représentation des différentes isoformes de la protéine tau humaine du SNC générées par épissage alternatif. ....	14
<b>Figure 3.</b> Représentation des domaines de la plus longue isoforme de tau. ....	16
<b>Figure 4.</b> Allure des filaments et des enchevêtrements neurofibrillaires de tau dans les tauopathies. ....	23
<b>Figure 5.</b> Sites de phosphorylation de la protéine tau mutés en alanine et en glutamate au cours de la présente étude. ....	38
<b>Figure 6.</b> Stratégie de mutagenèse « Altered Sites® II Mammalian Mutagenesis System » de Promega. ....	47
<b>Figure 7.</b> Stratégie de mutagenèse impliquant des étapes de PCR et de sous-clonage. ....	50
<b>Figure 8.</b> Principe de la stratégie de mutagenèse « QuikChange® XL site-directed mutagenesis kit » de Stratagene, utilisée pour générer tous les mutants de tau. ....	54
<b>Figure 9.</b> Aperçu du procédé employé pour incorporer une à la fois les mutations à la protéine tau avec la méthode de Stratagene. ....	57
<b>Figure 10.</b> Différents mutants de tau produits. ....	59
<b>Figure 11.</b> Visualisation de l'expression des protéines tau mutantes dans les cellules Hela.....	62
<b>Figure 12.</b> Distribution de la protéine tau endogène totale dans les neurones de l'hippocampe de rat au cours de leur développement en culture. ....	65
<b>Figure 13.</b> Distribution de la protéine tau endogène déphosphorylée dans les neurones de l'hippocampe de rat au cours de leur développement en culture. ....	68
<b>Figure 14.</b> Distribution de la protéine tau endogène phosphorylée dans les neurones de l'hippocampe de rat au cours de leur développement en culture. ....	70
<b>Figure 15.</b> Distribution de la protéine tau exogène humaine (GFP-Tau4R) dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après différentes périodes d'expression. ....	74
<b>Figure 16.</b> Distribution de la protéine tau exogène humaine (GFP-Tau4R) déphosphorylée dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après différentes périodes d'expression. ....	77

<b>Figure 17.</b> Distribution de la protéine tau exogène fœtale humaine (GFP-Tau3R) phosphorylée dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après différentes périodes d'expression. ....	80
<b>Figure 18.</b> Distribution de la protéine tau exogène fœtale humaine fusionnée à la GFP en 5' (GFP-Tau3R) et en 3' (Tau3R-GFP) dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture. ....	83
<b>Figure 19.</b> Distribution des protéines tau exogènes humaines fœtales (Tau3R) et adultes (Tau4R) fusionnées à Flag en N-terminal dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture. ....	86
<b>Figure 20.</b> Distribution de l'isoforme adulte de la protéine tau exogène de rat (Rat-Tau4R) dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture. ....	89
<b>Figure 21.</b> Distribution des différentes constructions de la protéine tau exogène dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après 48 heures d'expression. ....	92
<b>Figure 22.</b> Distribution des mutants de tau contenant 12 sites mutés en glutamate et en alanine dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après différentes périodes d'expression. ....	95

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**a.a.** : acide aminé

**ABPs** : « actin-binding proteins », protéines de liaison à l'actine

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire

**Ala** : alanine

**Amp** : ampicilline

**aPKC** : « atypical protein kinase C », protéine kinase C atypique

**APP** : « amyloid precursor protein », protéine précurseur de l'amyloïde

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**ATP** : adénosine triphosphate

**BMPs** : « bone morphogenetic proteins », protéines morphogénétiques des os

**CaMKII** : « calcium/calmodulin-dependant protein kinase II », protéine kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline

**Cdk** : « cyclin-dependant kinase », kinase dépendante de la cycline

**Cm** : chloramphénicol

**CMV** : cytomégalovirus

**CRMP-2** : « collapsin response mediator protein-2 », protéine médiatrice de la réponse à la collapsine 2

**DYRK** : « dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase »

**E. coli** : Escherichia coli

**EGFP** : « enhanced green fluorescent protein », protéine fluorescente verte amplifiée

**FTDP-17** : « frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 », démence fronto-temporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17

**G** : glycine

**GAP-43** : « growth-associated protein 43 », protéine associée à la croissance 43

**GFP** : « green fluorescent protein », protéine fluorescente verte

**Glu** : glutamate

**GSK3** : « glycogen synthase kinase 3 », kinase glycogène synthase 3

**GTP** : guanosine triphosphate

**h** : heure

**HMG-CoA réductase** : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase

**HyperP** : hyperphosphorylation

**IgG et IgM** : immunoglobulines G et M

**J** : jour

**KO** : « knock-out »

**LDL** : « low-density lipoprotein », lipoprotéine de faible densité

**Leu ou L** : leucine

**M** : methionine

**MAP** : « microtubule-associated protein », protéine associée aux microtubules

**MAPK** : « mitogen activated protein kinase », kinase activée par des mitogènes

**MARK** : « microtubule-affinity regulating kinase », kinase régulant l'affinité de tau pour les microtubules

**MCS** : « multiple cloning site », site de clonage multiple

**ME** : moelle épinière

**MTs** : microtubules

**Nbr** : nombre

**NF-L, -M, -H** : « neurofilament light, medium, heavy subunits », sous-unités légère, moyenne et lourde des neurofilaments

**NFTs** : « neurofibrillary tangles », enchevêtrements neurofibrillaires

**oligo.** : oligodendrocytes

**pb** : paire de bases (azotées)

**PCR** : « polymerase chain reaction », réaction de polymérisation en chaîne

**PDGF- $\beta$**  : « platelet-derived growth factor- $\beta$  », facteur de croissance dérivé des plaquettes  $\beta$

**PDPK** : « proline-directed protein kinase », protéine kinase dirigée par une proline

**PHFs** : « paired helical filaments », paires de filaments hélicoïdaux

**pIgR** : « polymeric immunoglobulin receptor », récepteur polymérique des immunoglobulines

**PKA** : « cyclic AMP-dependant kinase » ou « protein kinase A », protéine kinase dépendante de l'AMPc

**PKB, C ou N** : protéine kinase B, C ou N

**PK35/41** : protéine kinase de 35/41 Kd

**PP2A et PP2B** : protéine phosphatase 2A et 2B

**Pro ou P** : proline

**PrP** : « prion promotor », promoteur du prion

**PS1** : préséniline 1

**R** : arginine

**RER** : réticulum endoplasmique rugueux

**ROCK** : « Rho-associated kinase », kinase associée à Rho

**SAPK** : « stress activated protein kinase », protéine kinase activée par le stress

**Ser ou S** : sérine

**Sf9** : *Spodoptera frugiperda* 9

**SNARE** : « soluble NSF attachment protein receptor », récepteur NSF d'attachement protéique soluble

**SNC** : système nerveux central

**SNP** : système nerveux périphérique

**TfR** : « transferrin receptor », récepteur de la transferrine

**TGN** : « trans golgi network », réseau *trans*-golgien

**Thr ou T** : thréonine

**Tyr** : tyrosine

**V** : valine

**vs** : versus

**W** : tryptophane

**3R et 4R** : 3 et 4 répétitions

**3'UTR** : « 3'untranslated region », région 3' non traduite



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les personnes suivantes :

- Le Dr Nicole Leclerc, ma directrice de recherche, pour m'avoir donné la chance de faire mes études de maîtrise dans son laboratoire, pour avoir eu confiance en moi, pour sa disponibilité, son implication, ses bons conseils, son sens de l'humour et surtout son écoute. Merci.
- Les étudiants et membres du laboratoire, qui sont toujours présents ou qui ont déjà quitté, Carole Abi Farah, Angela Anton, Sébastien Perreault, Olivier Bousquet, Vibol Ing et particulièrement, Marilyse Piché pour son aide informatique considérable au moment de la rédaction de mon mémoire, de même que Dalinda Liazoghli pour m'avoir presque tout appris dans le laboratoire et surtout pour son amitié. Merci à tous pour les bonnes discussions sérieuses et le plus souvent, moins sérieuses, qui ont agrémenté davantage mon quotidien.
- Mes « parrains », le Dr Jacques Paiement et le Dr Adriana Di Polo, pour leurs conseils judicieux pendant mes études.
- Les autres étudiants et membres du Département de pathologie et biologie cellulaire, pour leur entraide et leur agréable compagnie, ainsi qu'une attention spéciale à Michel Lauzon pour les connaissances qu'ils m'a transmises à propos de la microscopie et des logiciels informatiques.
- Mon copain Francis pour son support, sa patience, son soutien moral et son aide tout au long de mes études.
- Mes amis et les membres de ma famille pour leurs encouragements et leur confiance en moi.

Je tiens également à remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), Sun Life du Canada, la Faculté des études supérieures et le Département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal, pour leur soutien financier, ce qui m'a permis de me consacrer totalement à mes études.

# **1. INTRODUCTION**

## **1.1. LE NEURONE**

### **1.1.1. Structure du système nerveux et du neurone**

Le système nerveux est le centre de régulation et de communication de l'organisme. Il joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie en recueillant l'information sensorielle, en la traitant et en y répondant. Sur le plan anatomique, le système nerveux est divisé en deux parties : le système nerveux central (SNC), composé du cerveau et de la moelle épinière, et le système nerveux périphérique (SNP), principalement formé des nerfs crâniens et rachidiens. Le SNC est le centre de régulation et d'intégration du système nerveux, alors que les nerfs du SNP constituent les lignes de communication entre le SNC et l'organisme.

Les deux classes majeures de cellules dans le système nerveux sont les neurones et les cellules gliales. Les cellules gliales servent de cellules de soutien et modulent l'activité des neurones (Auld and Robitaille, 2003), alors que ces derniers constituent les unités fonctionnelles du système nerveux. Ce sont eux qui acheminent les messages sous forme d'influx nerveux entre les différentes parties du corps. Ces cellules postmitotiques sont composées de quatre régions distinctes : le corps cellulaire, les dendrites, l'axone et les terminaisons présynaptiques (ou axonales). Les dendrites constituent la structure réceptrice des signaux électriques et l'axone forme la structure conductrice, qui achemine le signal (influx nerveux) à d'autres neurones ou à des effecteurs. Les terminaisons axonales forment la structure sécrétrice des neurones car elles libèrent des neurotransmetteurs dans l'espace extracellulaire. Ceux-ci vont exciter ou inhiber les neurones ou les cellules effectrices avec lesquels l'axone est en contact étroit (Kandel *et al.*, 2000).

### **1.1.2. Le cytosquelette neuronal**

Le cytosquelette est l'élément intrinsèque principal déterminant la forme d'un neurone. Il est composé de trois structures filamenteuses : les microtubules, les neurofilaments et les microfilaments d'actine.

### ***1.1.2.1. Les microtubules***

Les microtubules (MTs) sont composés de 13 protofilaments qui s'assemblent pour former une structure tubulaire de 25 à 28 nm de diamètre. Chaque protofilament est à son tour constitué de plusieurs dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , qui sont liés à la GTP lorsqu'ils s'ajoutent aux MTs (Hirokawa, 1991; Kandel *et al.*, 2000). Les MTs répondent au phénomène d'instabilité dynamique, c'est-à-dire que certains s'allongent pendant que d'autres raccourcissent. Ce phénomène de polymérisation et de dépolymérisation se produit de préférence à l'extrémité (+) de ces filaments polaires, qui sont tous orientés longitudinalement par rapport à la membrane plasmique (Horio and Hotani, 1986; Mitchison and Kirschner, 1984, 1988). Les MTs jouent un rôle déterminant dans le développement et le maintien des prolongements neuronaux (Ludin and Matus, 1993). Les neurones matures contiennent donc également des MTs stables, et ce grâce à l'action des protéines associées aux microtubules (MAPs). Ces protéines stabilisent les MTs en s'y liant, mais elles jouent aussi un rôle dans leur assemblage (Horio and Hotani, 1986; Hirokawa, 1994). Les MTs sont également essentiels au transport axonal des protéines et des organelles dans les prolongements neuronaux. C'est effectivement le long des MTs que ce transport se fait (Morris and Hollenbeck, 1995; Hirokawa, 1998).

### ***1.1.2.2. Les neurofilaments***

Les neurofilaments (NFs) sont les filaments intermédiaires de la cellule nerveuse. Ils sont formés de trois sous-unités protéiques fibreuses qui diffèrent par la longueur de leur domaine C-terminal. On parle alors de sous-unités légère (NF-L), moyenne (NF-M) et lourde (NF-H) (Lee and Cleveland, 1996). Les mécanismes d'assemblage sont peu connus mais il semble que la sous-unité NF-L doit absolument être présente pour induire la formation de NFs (Lee *et al.*, 1993). Ainsi, les sous-unités NF-L et NF-M (ou NF-H) s'enroulent pour former un dimère, puis deux dimères forment un protofilament. Deux protofilaments s'assemblent ensuite en protofibrille et l'enroulement de protofibrilles forme le NF, d'un diamètre d'environ 10 nm (Shaw, 1991; Kandel *et al.*, 2000). Les NFs constituent la structure la plus stable du cytosquelette et sont presque totalement polymérisés. Ils sont donc localisés dans des régions de la cellule qui nécessitent une plus grande stabilité, comme l'axone des motoneurones (Grant and Pant, 2000). Les NFs seraient également impliqués dans l'établissement du diamètre radial de l'axone via leur

nombre (Xu *et al.*, 1996) et leur état de phosphorylation (de Waegh *et al.*, 1992). En effet, la phosphorylation du domaine C-terminal de NF-M et NF-H, qui projettent à la surface des NFs, augmenterait leur espacement et par le fait même, le diamètre de l'axone (de Waegh *et al.*, 1992).

### **1.1.2.3. Les microfilaments d'actine**

Les microfilaments d'actine sont les filaments les plus minces du cytosquelette; ils ont un diamètre d'environ 5 nm. Dans les neurones, les microfilaments sont composés des isoformes  $\beta$  et  $\gamma$ , des monomères globulaires d'actine enroulés en double hélice (Bamburg and Bernstein, 1991; Kandel *et al.*, 2000). Comme les microtubules, les microfilaments d'actine sont des structures polaires et dynamiques. La polymérisation se fait principalement à l'extrémité (+), en présence d'ATP (Ludin and Matus, 1993). Ils forment, avec un grand nombre de protéines de liaison à l'actine (ABPs), un réseau dense et complexe de filaments en treillis concentrés en périphérie de la cellule, juxtaposés à la membrane plasmique (Kandel *et al.*, 2000; Luo, 2002). Chez les neurones immatures, ils sont concentrés dans les cônes de croissance, qui sont composés d'une lamellipode et de plusieurs filopodes. Dans la lamellipode, les microfilaments forment un réseau en treillis, alors que dans les filopodes ils adoptent une disposition en faisceaux parallèles (Luo, 2002). Ils permettent ainsi la mobilité du cône de croissance et par le fait même, la pousse neuritique (Suter and Forscher, 2000; Luo, 2002). Ils exercent donc un rôle important durant le développement. Chez les neurones matures, ils sont concentrés dans les épines dendritiques, où ils interviennent dans la transmission synaptique (Kaeck *et al.*, 1999).

### **1.1.3. La polarité neuronale**

Avant d'atteindre leur maturité, les neurones subissent une série de modifications morphologiques et biochimiques qui mènent à l'acquisition de leur caractère polaire, c'est-à-dire leur organisation structurale asymétrique constituée de deux types de prolongements distincts, les dendrites et l'axone. Cette polarité neuronale est également acquise *in vitro* par les neurones de l'hippocampe, ce qui en permet alors l'étude (Dotti and Banker, 1987; Dotti *et al.*, 1988; Goslin and Banker, 1989).

### ***1.1.3.1. Établissement de la polarité***

L'hippocampe constitue une source relativement homogène de neurones pyramidaux (85 à 90% de la population totale) et cette population possède des propriétés typiques des neurones du SNC en général (Goslin *et al.*, 1998). Ainsi, grâce aux cultures primaires de neurones de l'hippocampe, Dotti *et al.* (1988) ont pu établir la séquence des événements morphologiques par lesquels les neuroblastes apolaires se transforment en neurones polaires (Figure 1, p. 6). Ces événements ont été divisés en cinq étapes. La première consiste en la formation de lamellipodes mobiles autour de la cellule, peu de temps après son attachement au substrat. Le deuxième stade est caractérisé par la transformation des lamellipodes en plusieurs prolongements similaires (en général 4 à 6), les neurites mineures, dont l'identité dendritique ou axonale demeure encore indéterminée. Ces prolongements hautement dynamiques s'allongent et se rétractent sur de courtes distances pendant une période de 12 à 24 heures. Suivant cette période, une de ces neurites entame une phase de croissance rapide et devient beaucoup plus longue que les autres. Il s'agit du stade 3, l'étape de formation de l'axone. La polarité apparaît donc très tôt dans le développement neuronal. Deux à trois jours après la croissance axonale, les autres neurites mineures commencent à s'allonger pour former les dendrites (stade 4). Finalement, vient la phase de maturation des neurones (stade 5), au cours de laquelle la densité du réseau axonal augmente, l'arbre dendritique devient beaucoup plus élaboré, les contacts synaptiques se forment, les épines dendritiques apparaissent et une activité électrique spontanée se propage dans le réseau neuronal (Goslin *et al.*, 1998).

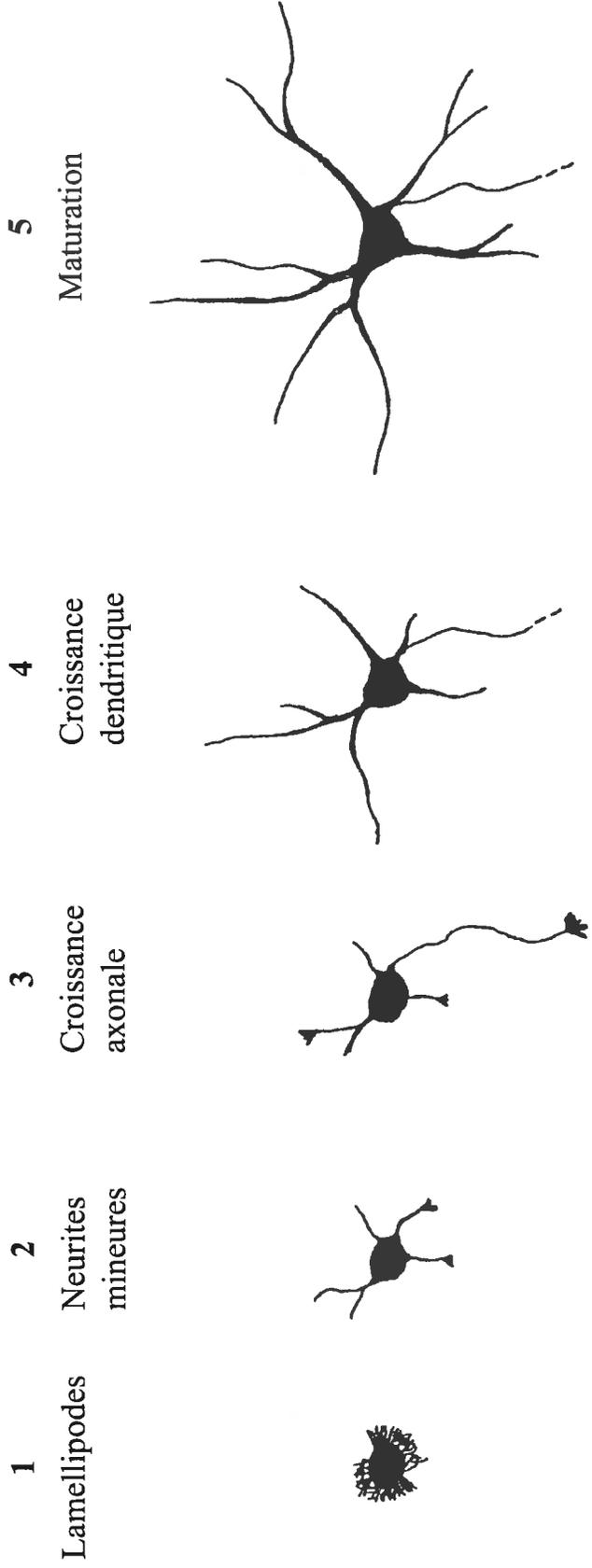
### ***1.1.3.2. Niveau morphologique***

Plusieurs aspects distinguent l'axone des dendrites au niveau morphologique. D'abord, les dendrites croissent plus lentement et plusieurs à la fois, contrairement à l'axone (Dotti *et al.*, 1988). Ensuite, les dendrites sont relativement courtes, droites, possèdent de nombreux embranchements en forme de « Y » et leur diamètre, épais à la base, s'amincit progressivement vers l'extrémité (Bartlett and Banker, 1984a; Caceres *et al.*, 1986). Par microscopie électronique, on distingue des épines sur ces prolongements (Bartlett and Banker, 1984b). L'axone, quant à lui, est long, tortueux et son diamètre est assez uniforme, mais plus mince que celui de la portion distale des dendrites (Bartlett & Banker, 1984a, b). Les axones de plusieurs cellules s'entrecroisent les uns avec les autres,

**Figure 1. Stades de développement des neurones de l'hippocampe en culture.**

La figure représente les changements morphologiques conduisant à l'établissement des compartiments dendritique et axonal des neurones (polarité neuronale). Les cinq stades y sont schématisés : la formation de lamellipodes (stade 1), la croissance des neurites mineures (stade 2), la formation et la croissance de l'axone (stade 3), la croissance des dendrites (stade 4) et la maturation des neurones (stade 5). Aux stades 4 et 5, l'axone n'est schématisé qu'en partie et se termine par un trait pointillé pour montrer qu'il est en réalité beaucoup plus long que les dendrites. Le temps approximatif auquel les cellules atteignent chacune de ces étapes de développement est indiqué au bas de la figure.

**Stades de développement:**



**Jours en culture:**

0,25	0,5	1,5	4	7 et +
------	-----	-----	---	--------

Modifié de Dotti et al., 1988, J. Neurosci. 8: 1454-1468.

sont fasciculés et forment un vaste plexus (Caceres *et al.*, 1986). Enfin, le cône de croissance des axones est généralement plus gros que celui des dendrites (Bradke and Dotti, 1999).

#### ***1.1.3.3. Niveau cytosquelettique***

En ce qui concerne leur cytosquelette, les axones contiennent plus de neurofilaments que les dendrites (Mattson, 1999) et la sous-unité NF-H est indétectable dans ces dernières (Shaw *et al.*, 1985). La densité de microtubules est également plus élevée dans l'axone que dans les dendrites et l'espacement entre ceux-ci est plus petit dans l'axone (Bartlett and Banker, 1984b). Enfin, la polarité des MTs est uniforme dans l'axone, c'est-à-dire que toutes les extrémités (+) sont orientées vers les terminaisons axonales, alors que dans les dendrites elle est mixte (Baas *et al.*, 1988, 1989).

#### ***1.1.3.4. Niveau fonctionnel***

La polarité neuronale ne fait pas seulement référence à la morphologie et au cytosquelette du neurone. D'un point de vue fonctionnel, elle se manifeste par le fait que les dendrites et l'axone sont principalement postsynaptiques (récepteurs) et présynaptique (émetteur) respectivement (Bartlett and Banker, 1984b). Les signaux électriques se propagent donc dans une seule direction, soit des dendrites vers l'extrémité de l'axone.

#### ***1.1.3.5. Niveau biochimique***

La polarisation dépend également d'une distribution adéquate des organelles et des composantes moléculaires et biochimiques dans les différents compartiments cellulaires. Généralement, toutes les organelles présentes dans le corps cellulaire le sont également dans les dendrites, bien que la concentration de certaines diminue en s'éloignant du corps (Kandel *et al.*, 2000). Cependant, les endosomes (Horton and Ehlers, 2003), l'appareil de Golgi (De Camilli *et al.*, 1986), le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et les lysosomes sont pour la plupart exclus de l'axone (Kandel *et al.*, 2000). Celui-ci est cependant riche en vésicules synaptiques (Cameron *et al.*, 1991) et donc en synapsine I, en synaptophysine (Fletcher *et al.*, 1991) et en synaptobrevine (West *et al.*, 1997b). Dans les terminaisons présynaptiques de l'axone, sont concentrés des transporteurs tels que GAT-1, un transporteur de neurotransmetteurs GABA (Minelli *et al.*, 1995) et le transporteur GLYT2 de la glycine (Poyatos *et al.*, 2000). Certains récepteurs sont quant à eux



exclusivement dendritiques, comme les récepteurs du glutamate métabotropiques mGluR1a, mGluR2 et la sous-unité GluR1 des récepteurs ionotropiques AMPA (Stowell and Craig, 1999; Ruberti and Dotti, 2000), les récepteurs TfR (« transferrin receptor ») (Cameron *et al.*, 1991; West *et al.*, 1997a), pIgR (« polymeric Ig receptor ») (de Hoop *et al.*, 1995) et les récepteurs du LDL (« low-density lipoprotein ») (Brown *et al.*, 1997). Les dendrites et l'axone des neurones du SNC contiennent aussi des canaux ioniques de différents types : Shal K<sup>+</sup> dans les dendrites (Rivera *et al.*, 2003) et Shaker K<sup>+</sup> dans l'axone, par exemple (Monaghan *et al.*, 2001). Les MAPs sont également distribuées différemment dans ces deux compartiments, tau (Dotti *et al.*, 1987) et CRMP-2 (« collapsin response mediator protein-2 ») (Fukata *et al.*, 2002) étant principalement axonales, alors que MAP2 est dendritique (Caceres *et al.*, 1984a, 1986). D'autres protéines se retrouvent uniquement au niveau de l'axone, comme la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Tienari *et al.*, 1996) ou les protéines Par3 et Par6 du complexe Par3/Par6/aPKC, un signal de polarisation (Shi *et al.*, 2003). C'est également le cas de certaines protéines membranaires, telles que VAMP2 et NgCAM (Sampo *et al.*, 2003), et de la protéine neuronale associée à la croissance GAP-43, qui est quant à elle concentrée au niveau du cône de croissance axonal dès le stade 3 du développement (Goslin *et al.*, 1988, 1990; Goslin and Banker, 1990). Il y aurait également une distribution axonale et dendritique distincte des protéines SNARE (« soluble NSF attachment protein receptor ») (Horton and Ehlers, 2003) et même une différence entre les niveaux de calcium intracellulaire à la base des axones et des dendrites, celui des axones étant plus faible (Mattson and Partin, 1999).

#### ***1.1.3.6. Mécanismes d'établissement et de maintien de la polarité***

Cette architecture polarisée est essentielle à la fonction particulière des neurones. Il semble cependant que toutes les neurites mineures ont la capacité de se développer en axone, mais dès l'acquisition des propriétés axonales par une de celles-ci, les autres demeurent des dendrites (Dotti and Banker, 1987; Goslin and Banker, 1989). Des mécanismes régissant l'établissement et le maintien de cette polarité doivent donc entrer en jeu. Ils commencent cependant à peine à être compris. Chose certaine, le cytosquelette y joue un rôle important. Lors de la pousse neuritique (stade 2), le futur cône de croissance axonal devient très dynamique (Bradke and Dotti, 1999) et il semblerait que l'instabilité

des microfilaments d'actine déterminerait l'étape initiale de la polarisation neuronale en permettant l'élongation des microtubules dans le cône de croissance (Bradke and Dotti, 2000). De plus, l'établissement de la polarité neuronale impliquerait la famille des GTPases Rho (Nobes and Hall, 1999) et le complexe protéique Par3/Par6/aPKC (Shi *et al.*, 2003), qui contrôlent la régulation du cytosquelette d'actine. Le calcium intracellulaire et les mitochondries auraient également un rôle à jouer (Mattson and Partin, 1999). Des facteurs extrinsèques, comme les neurotrophines, les neurotransmetteurs et les protéines BMPs (« bone morphogenetic proteins ») sont eux aussi impliqués (Horton and Ehlers, 2003). Ainsi, une combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques est essentielle, mais les mécanismes régulant le tout sont loin d'être élucidés.

Une fois la polarité établie, d'autres mécanismes doivent également en assurer le maintien. Le cytosquelette est encore une fois impliqué. La différence entre l'orientation des microtubules dans les dendrite (polarité mixte) et dans l'axone (polarité uniforme) permettrait un mouvement ordonné et une distribution asymétrique des diverses protéines et organelles au sein du neurone (Baas, 1999). De plus, les complexes protéiques « exocyst » (Murthy *et al.*, 2003) et SNARE (McNew *et al.*, 2000; Parlati *et al.*, 2002) coordonneraient et cibleraient la fusion des vésicules avec la membrane plasmique à des sites précis. Les protéines et les lipides seraient ensuite maintenus en place grâce à des barrières empêchant leur diffusion dans la membrane. Plusieurs études ont ainsi montré que le segment initial de l'axone fonctionnerait comme une barrière de diffusion dans les neurones matures (Kobayashi *et al.*, 1992; Winckler *et al.*, 1999; Nakada *et al.*, 2003), ce qui mène à croire que ce serait un des principaux moyens permettant le maintien de la polarité neuronale. En somme, des progrès considérables ont été faits pour identifier les éléments impliqués dans la polarité neuronale, mais les mécanismes qui orchestrent cette « machinerie » de polarisation demeurent encore obscurs.

## 1.2. LES MAPS

La famille des protéines associées aux microtubules (MAPs), également impliquées dans le phénomène de polarisation neuronale (Mandell and Banker, 1996b), compte plusieurs membres. En plus de la protéine tau, qui nous intéresse particulièrement ici et qui

sera traitée dans la section suivante, deux autres MAPs sont exprimées dans les neurones, soient MAP1 et MAP2.

### 1.2.1. La MAP1

La protéine MAP1 fait partie du groupe des MAPs de haut poids moléculaire (Matus, 1988). On compte deux isoformes de MAP1 : MAP1A et MAP1B. Ces deux isoformes sont transcrites à partir de gènes différents, le premier étant situé sur le chromosome 2 et le second sur le chromosome 13 (Garner *et al.*, 1990). Leur domaine de liaison aux microtubules diffère de celui de MAP2 et tau. Il s'agit d'une région basique située en N-terminal et contenant un motif à quatre acides aminés répétés 21 fois (Noble *et al.*, 1989). MAP1A et B sont toutes deux présentes dans l'ensemble des compartiments cellulaires des neurones (Bloom *et al.*, 1984; Riederer *et al.*, 1986). Cependant, MAP1B est la première MAP à être exprimée durant le développement (Tucker *et al.*, 1988) et son expression diminue substantiellement par la suite, alors que celle de MAP1A augmente avec le développement (Schoenfeld *et al.*, 1989). L'inhibition de l'expression de MAP1B par des oligonucléotides antisens empêche la pousse neuritique dans les cellules PC12 (Brugg *et al.*, 1993). Dans les neurones, elle jouerait un rôle important dans les stades initiaux de l'axogénèse en maintenant le cytosquelette du cône de croissance axonal dans un état d'instabilité dynamique (Gonzalez-Billault *et al.*, 2001, 2002), contrairement à la fonction habituelle des MAPs qui est de stabiliser les microtubules (Horio and Hotani, 1986). MAP1B est toutefois également reconnue pour stimuler l'assemblage des microtubules *in vitro* (Kuznetsov *et al.*, 1981; Riederer *et al.*, 1986). Enfin, MAP1B serait essentielle au développement adéquat du SNC et du SNP chez les mammifères (Takei *et al.*, 1997; Meixner *et al.*, 2000).

### 1.2.2. La MAP2

La protéine MAP2 comprend également plusieurs isoformes (A, B, C et D), mais elles sont générées par l'épissage alternatif d'un pré-ARNm transcrit à partir d'un gène unique situé sur le chromosome 2 (Neve *et al.*, 1986; Garner and Matus, 1988). On sépare ces isoformes en deux groupes : MAP2A et B sont des MAPs de haut poids moléculaire, alors que MAP2C et D sont de faible poids moléculaire (Sanchez *et al.*, 2000). Leur

domaine de liaison aux microtubules, très similaire à celui de tau, est constitué de 3 ou 4 séquences répétées de 18 acides aminés, situées dans la région C-terminale (Lewis *et al.*, 1988; Doll *et al.*, 1993).

Les protéines MAP2A, B et C sont exprimées spécifiquement dans les neurones (Caceres *et al.*, 1984b), alors que MAP2D l'est également dans les cellules gliales (Ferhat *et al.*, 1994; Vouyiouklis and Brophy, 1995). Cependant, ces protéines ne sont pas toutes exprimées au même moment. MAP2A l'est principalement dans le cerveau adulte, alors que MAP2B (Binder *et al.*, 1984) et MAP2D (Doll *et al.*, 1993) sont présentes tout au long du développement. MAP2C est quant à elle exprimée seulement au début du développement (Goedert *et al.*, 1991) et on la retrouve dans tous les compartiments du neurone (Meichsner *et al.*, 1993). MAP2B démontre aussi cette distribution uniforme, mais uniquement au cours des premiers stades de développement (jusqu'au jour 2) des neurones de l'hippocampe en culture (Caceres *et al.*, 1986). À mesure que le développement progresse, elle disparaît de l'axone pour finalement être principalement localisée dans le compartiment somato-dendritique après une semaine (à partir du stade 4). Très peu ou pas de MAP2 est alors détectable dans les axones, mis à part la base de ceux-ci où elle peut persister même à des stades avancés du développement (Caceres *et al.*, 1986). Cette distribution est également observée dans les hippocampes *in situ* (Caceres *et al.*, 1984b).

MAP2 semble essentielle durant la pousse neuritique. En effet, aucune croissance des neurites n'est observée lorsque l'expression de MAP2 est supprimée à l'aide d'oligonucléotides antisens (Caceres *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 1994). De plus, la surexpression de MAP2 dans des cellules non neuronales entraîne la croissance de prolongements cytoplasmiques similaires aux neurites (LeClerc *et al.*, 1993; Leclerc *et al.*, 1996). En s'associant aux microtubules, MAP2 entraînerait leur stabilisation et par le fait même, leur croissance (Kowalski and Williams, 1993; Yamauchi *et al.*, 1993). MAP2 est aussi reconnue pour promouvoir la polymérisation de la tubuline *in vitro* (Sloboda *et al.*, 1976) et semble requise pour permettre l'élongation des dendrites (Harada *et al.*, 2002). Il a également été démontré que MAP2 pourrait être impliquée dans l'arrêt de la division cellulaire afin de permettre la différenciation morphologique normale du neurone (Dinsmore and Solomon, 1991).

## 1.3. LA PROTÉINE TAU

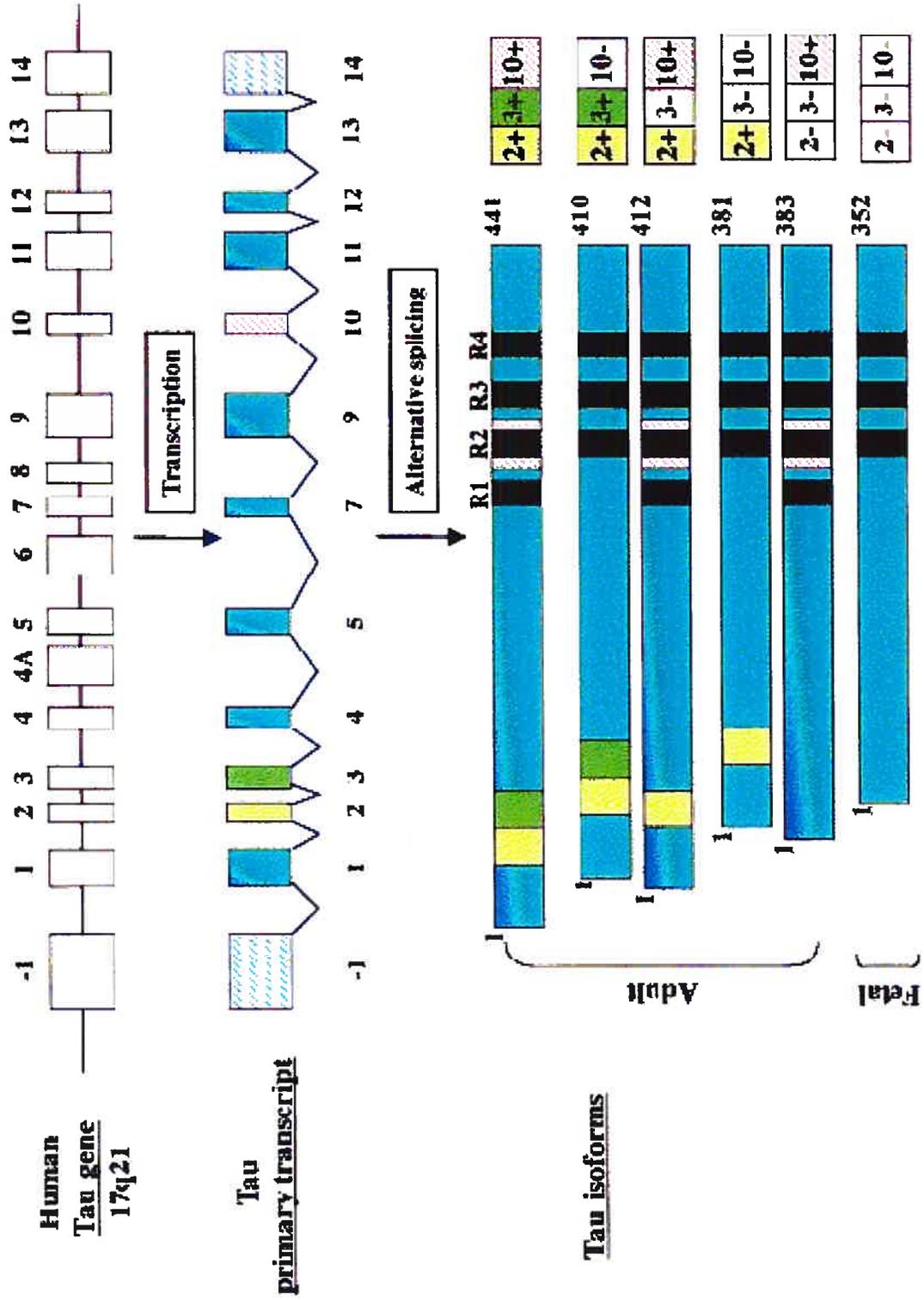
### 1.3.1. Structure génique et protéique

La protéine tau fait partie de la famille des MAPs de faible poids moléculaire (Matus, 1988). Le gène codant pour la protéine tau humaine est unique. Il est situé sur le bras long du chromosome 17, à la position 17q21, et contient 16 exons (Figure 2, p. 14) (Neve *et al.*, 1986; Andreadis *et al.*, 1992). Toutefois, aucun ARNm contenant les exons 6 et 8 n'a été observé chez l'humain (Nelson *et al.*, 1996) et l'exon 4A est spécifique à la protéine tau du SNP (Couchie *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1992b). L'exon -1, qui fait partie du promoteur, et l'exon 14 sont transcrits mais non traduits (Andreadis *et al.*, 1992; Sawa *et al.*, 1994). Dans le cerveau humain, l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 génère six isoformes de la protéine, contenant de 352 à 441 acides aminés et dont les poids moléculaires observés par SDS-PAGE varient entre 45 et 65 kDa. Ces isoformes diffèrent par la présence de 3 ou 4 séquences répétées de 31 ou 32 acides aminés dans la région C-terminale, qui sont codées par les exons 9 à 12 (Goedert *et al.*, 1989a, b; Buee *et al.*, 2000). Elles diffèrent également par l'absence ou la présence de 1 ou 2 inserts (29 ou 58 acides aminés) dans la portion N-terminale, qui correspondent aux exons 2 et 3 du gène (Goedert *et al.*, 1989a; Himmler *et al.*, 1989). Seule l'isoforme dont les trois exons en question ont été épissés (la plus courte) est exprimée dans le cerveau fœtal, alors que les six isoformes apparaissent durant la période postnatale du cerveau adulte (Goedert *et al.*, 1989b; Kosik *et al.*, 1989).

Les séquences répétitives R1 à R4 de la région carboxy-terminale ont été reconnues pour former le domaine de liaison aux microtubules de la protéine tau (Figure 3, p. 16). Comme c'était le cas pour MAP2 (Lewis *et al.*, 1988), ces séquences sont constituées de répétitions très conservées de 18 acides aminés, séparées les unes des autres par des domaines moins conservés de 13 ou 14 acides aminés (Himmler *et al.*, 1989; Kanai *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1989). Dans la partie amino-terminale, on retrouve les deux inserts de 29 acides aminés qui sont très acides, suivis par une région basique riche en résidus proline (Buee *et al.*, 2000). Cette portion est définie comme étant le domaine de projection de la protéine car il fait saillie à la surface des microtubules (Hirokawa *et al.*, 1988). L'ensemble forme une protéine hydrophile qui adopte une structure allongée en forme de bâtonnet (Hirokawa *et al.*, 1988).

**Figure 2. Représentation des différentes isoformes de la protéine tau humaine du SNC générées par épissage alternatif.**

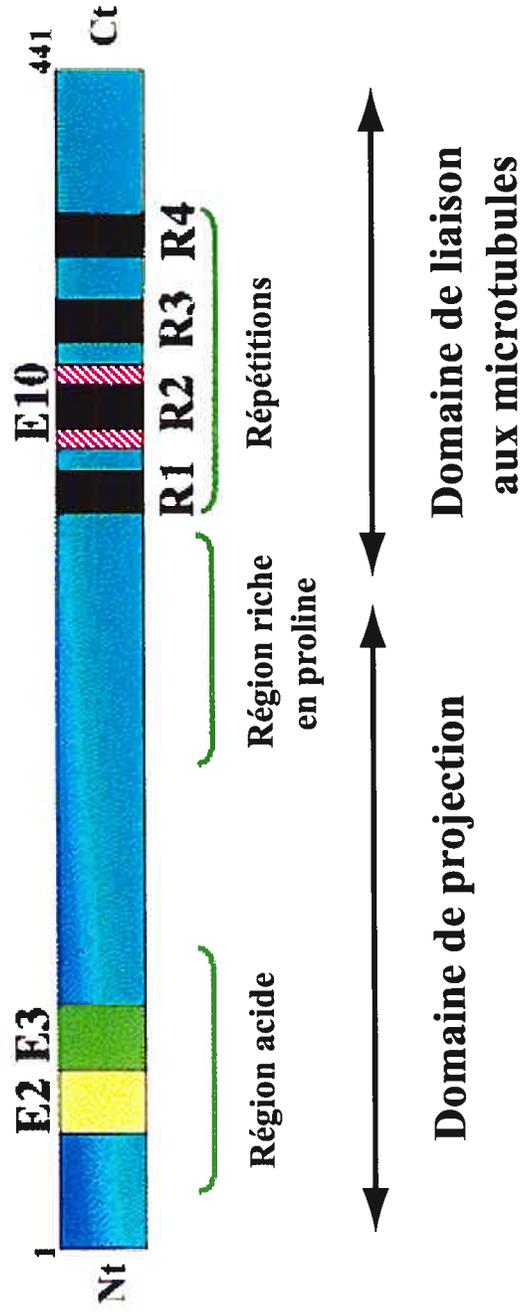
Le gène de la protéine tau humaine, localisé sur le chromosome 17 (17q21), est constitué de 16 exons avec l'exon -1 qui fait partie du promoteur (schéma du haut). Le transcrit primaire en contient cependant 13 car les exons 4A, 6 et 8 ne sont pas transcrits dans le cerveau humain (schéma du centre). Les exons -1 et 14 sont transcrits mais non traduits et les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs. Les exons 2 (boîte jaune), 3 (boîte verte) et 10 (boîte rayée rouge) subissent un épissage alternatif donnant lieu à 6 ARNm différents qui seront traduits en 6 isoformes de tau distinctes dans le SNC (schéma du bas). Ces isoformes diffèrent donc par l'absence ou la présence de 1 ou 2 inserts de 29 acides aminés, codés par les exons 2 et 3 de la région amino-terminale, en combinaison avec 3 (R1, R3 et R4) ou 4 (R1 à R4) séquences répétées (boîtes noires) de la région carboxy-terminale, codées par les exons 9 à 12. La séquence épissée ou non (exon 10) correspond donc à la 2<sup>e</sup> répétition (R2). Seule la plus courte isoforme de 352 acides aminés, dont les exons 2, 3 et 10 sont absents (2-, 3-, 10-), est exprimée dans le cerveau fœtal. Les 6 isoformes (441, 410, 412, 381, 383 et 352 acides aminés) se retrouvent cependant chez l'adulte.



**Figure 3. Représentation des domaines de la plus longue isoforme de tau.**

L'isoforme de tau de 441 acides aminés est schématisée pour montrer les différents domaines de la protéine. La section N-terminale (Nt) de la protéine tau forme le domaine de projection. Celui-ci renferme une région acide, constituée par les inserts de 29 acides aminés codés par les exons 2 (E2, en jaune) et 3 (E3, en vert), suivie par une région riche en proline. Vient ensuite, dans la partie C-terminale (Ct), le domaine de liaison aux microtubules qui est formé des 4 séquences répétées (R1 à R4, en noir) codées par les exons 9 à 12 respectivement. Seul l'exon 10 (E10, rayé rouge) est identifié.





Modifié de Buée et al., 2000, Brain Res. Rev. 33: 95-130.

### 1.3.2. Localisation de tau

Tau est une protéine essentiellement neuronale. Dans des coupes de différentes régions du cerveau de rat, on l'observe principalement dans l'axone des neurones (Binder *et al.*, 1985) et cette localisation est valable autant pour l'isoforme juvénile que pour les isoformes adultes (Brion *et al.*, 1988). De plus, les axones de neurones en culture montrent une augmentation progressive de la concentration de tau vers leur extrémité distale (Black *et al.*, 1996). Cependant, elle se retrouve dans tous les compartiments neuronaux durant les premiers stades de développement des neurones de l'hippocampe en culture (Mandell and Banker, 1996a) et une faible quantité persiste tout de même dans le corps cellulaire et les dendrites de ces neurones adultes *in situ* (Dotti *et al.*, 1987). Des protéines tau sont également retrouvées dans le noyau des neurones, mais la raison de cette distribution est encore mal comprise (Brady *et al.*, 1995).

#### 1.3.2.1. Mécanismes impliqués dans la localisation axonale de tau

Plusieurs mécanismes seraient responsables de la présence de la protéine tau dans l'axone. Premièrement, elle serait synthétisée dans le corps cellulaire puis transportée dans l'axone par un processus encore inconnu (Mattson, 1999). Le corps cellulaire des neurones a d'ailleurs longtemps été considéré comme l'unique source de protéines axonales. Cependant, de plus en plus d'évidences tendent à démontrer la présence d'une synthèse protéique locale dans l'axone (Koenig and Giuditta, 1999; Giuditta *et al.*, 2002). Cette idée est également supportée par les études de Ginzburg et son équipe, qui ont montré l'existence de ribosomes et d'ARNm de tau dans l'axone. Leurs études ont aussi démontré que cette localisation de l'ARNm de tau a lieu grâce à la présence d'un signal de ciblage axonal situé dans sa région 3' non traduite, qui permettrait alors son transport le long des microtubules suite à son association avec des protéines de liaison à l'ARN (Litman *et al.*, 1993, 1994; Aronov *et al.*, 2001, 2002). Une synthèse protéique locale de tau pourrait donc avoir lieu suite au transport de son ARNm dans l'axone. Finalement, la protéine pourrait ensuite être stabilisée au niveau de l'axone en raison de sa plus forte affinité de liaison avec les MTs axonaux (Hirokawa *et al.*, 1996).

### 1.3.3. Fonctions de tau

#### 1.3.3.1. *Domaine de liaison aux microtubules*

La principale caractéristique de la protéine tau est sa liaison avec les MTs, plus précisément avec la région C-terminale acide de la tubuline (Serrano *et al.*, 1985). Cette liaison se fait longitudinalement sur la surface externe des protofilaments microtubulaires lorsque les MTs sont déjà assemblés (Al-Bassam *et al.*, 2002). Cependant, quand la protéine tau est mélangée avec la tubuline et que l'assemblage a lieu par la suite, elle se lie à la surface interne des MTs (Kar *et al.*, 2003).

Depuis longtemps déjà, on a montré que tau était purifiée avec la tubuline et qu'elle induisait sa polymérisation *in vitro* (Weingarten *et al.*, 1975; Cleveland *et al.*, 1977). Ainsi, tau serait requise non seulement pour l'initiation de l'assemblage mais aussi pour l'élongation des MTs à partir de tubuline purifiée (Witman *et al.*, 1976; Brandt and Lee, 1993). *In vivo*, lorsque la protéine tau est injectée dans des cellules qui n'en contiennent pas de façon endogène (fibroblastes), elle s'associe spécifiquement avec les MTs, induit une augmentation de la polymérisation de la tubuline et stabilise les MTs contre la dépolymérisation (Drubin and Kirschner, 1986). Plus tard, on a montré que l'efficacité de tau à se lier aux MTs (Lee *et al.*, 1989) et à promouvoir leur assemblage (Goedert and Jakes, 1990) était meilleure pour les isoformes à quatre répétitions (4R). D'ailleurs, la partie de tau possédant la plus grande affinité de liaison pour les MTs est une région située entre les répétitions 1 et 2, qui n'est donc présente que chez les isoformes 4R (Goode and Feinstein, 1994). Ainsi, l'absence de ces isoformes durant le début du développement neuronal pourrait permettre l'instabilité des MTs requise par les neurones immatures, alors que leur présence chez l'adulte aurait l'effet contraire (Lee, 1990; Goode and Feinstein, 1994).

#### 1.3.3.2. *Domaine de projection*

La région riche en proline du domaine de projection est également impliquée dans la liaison de la protéine tau avec les MTs. Elle renforce cette liaison et augmente l'assemblage des MTs grâce à des interactions intramoléculaires entre cette région et celle contenant les répétitions du domaine de liaison aux MTs (Goode *et al.*, 1997). De plus, le domaine de projection détermine l'espacement entre les MTs de l'axone (Chen *et al.*,

1992; Leclerc *et al.*, 1996) et servirait à lier les MTs adjacents ensemble (Hirokawa *et al.*, 1988). Il serait donc impliqué dans la stabilisation des MTs. Il interagit également avec la membrane plasmique, pouvant ainsi faire le lien entre celle-ci et les MTs (Brandt *et al.*, 1995). Plus récemment, on a découvert que le composant membranaire responsable de cette liaison est le domaine SH3 de tyrosine kinases telles que fyn (« src-family non-receptor tyrosine kinases ») et qu'il se lie à la région riche en proline de tau. De plus, il y aurait une association entre le complexe tau-fyn et l'actine, ce qui suggère un rôle pour tau dans la cascade de signalisation de la famille src de tyrosine kinases, qui pourrait modifier la forme de la cellule en agissant sur le cytosquelette d'actine (Lee *et al.*, 1998). Tau pourrait également jouer un rôle dans la transduction de signal impliquant la phospholipase C- $\gamma$ , en s'y liant encore une fois par l'intermédiaire de sa région riche en proline (Hwang *et al.*, 1996; Jenkins and Johnson, 1998). On a aussi démontré sa liaison avec la spectrine (Carlier *et al.*, 1984), les filaments d'actine (Correas *et al.*, 1990; Henriquez *et al.*, 1995) et les neurofilaments (Leterrier *et al.*, 1982; Aamodt and Williams, 1984; Heimann *et al.*, 1985). Tau permet donc d'interconnecter les MTs avec d'autres composants du cytosquelette et peut ainsi réduire leur flexibilité (Matus, 1994). Elle pourrait également interagir avec des organelles cytoplasmiques, comme les mitochondries, et ainsi permettre la liaison de celles-ci avec les MTs (Rendon *et al.*, 1990).

#### **1.3.3.3. Rôle de tau dans la formation de l'axone**

Des études utilisant des oligonucléotides antisens pour inhiber l'expression de la protéine tau ont montré que son absence entraînait des défauts dans la formation des neurites et qu'elle jouerait donc un rôle essentiel dans l'établissement de la polarité neuronale (Caceres and Kosik, 1990; Caceres *et al.*, 1991). De plus, le fait que tau se lie à la base du cône de croissance de l'axone très tôt dans le développement neuronal suggère un rôle important dans la modulation des caractéristiques liées à la croissance axonale (Kempf *et al.*, 1996). D'ailleurs, l'expression de tau dans les cellules *Spodoptera frugiperda* (Sf9) non neuronales induit la formation de longues extensions cytoplasmiques (Knops *et al.*, 1991). De plus, la transfection de fibroblastes avec l'ADNc de tau entraîne la formation d'épais faisceaux de microtubules (Kanai *et al.*, 1989) et ce phénomène est plus important lorsque les exons 2 et 3 sont présents dans la protéine (Kanai *et al.*, 1992). Tout ceci laisse supposer que tau joue un rôle dans la formation et le maintien des neurites.

Chez des souris où le gène de tau a été inactivé, les seuls changements notés sont une diminution de la stabilité des microtubules et une modification de leur organisation dans certains axones de petit calibre (Harada *et al.*, 1994). Ceux-ci présentent en effet une baisse de densité microtubulaire, de même qu'une diminution de la fréquence des ponts entre les MTs. Par contre, ces souris ne montrent aucun phénotype anormal apparent ni d'anomalies de l'élongation axonale ou de la polarisation neuronale. Il se pourrait qu'une augmentation de la MAP1A, observée chez ces souris, vienne compenser l'absence de tau. D'ailleurs, une redondance fonctionnelle quant à la croissance axonale a été observée entre MAP1B et tau (DiTella *et al.*, 1996; Takei *et al.*, 2000). Une étude plus récente a tout de même démontré que les souris KO pour tau développent une faiblesse musculaire et certaines altérations comportementales à un âge avancé, suggérant ainsi une certaine atteinte neurologique due à l'absence de tau (Ikegami *et al.*, 2000).

## 1.4. TAU ET NEURODÉGÉNÉRESCENCE

### 1.4.1. Tauopathies et enchevêtrements neurofibrillaires

La protéine tau est impliquée dans plusieurs neuropathologies, que l'on regroupe sous le terme de « tauopathies » (Tableau I, p. 21) et dont la plus connue est certainement la maladie d'Alzheimer. La caractéristique commune à toutes ces maladies neurodégénératives est la présence d'une accumulation intracellulaire de la protéine tau sous forme de dépôts filamenteux insolubles (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Goedert *et al.*, 1988; Kosik *et al.*, 1988; Wischik *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2001). Ceux-ci ont le plus souvent l'aspect de paires de filaments hélicoïdaux (PHFs) ou de filaments droits (Kidd, 1963; Spillantini and Goedert, 1998). Ils sont principalement composés de la protéine tau anormalement hyperphosphorylée (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Lee *et al.*, 1991; Bramblett *et al.*, 1992; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995b). Ces filaments s'agrègent ensuite pour former des enchevêtrements neurofibrillaires ou « tangles » (NFTs) qui s'accumulent dans le compartiment somato-dendritique des neurones affectés (Kowall and Kosik, 1987; Braak *et al.*, 1994) (Figure 4, p. 23). Ce processus dégénératif est appelé la « dégénérescence neurofibrillaire ».

Une hétérogénéité quant aux isoformes de tau qui entrent dans la composition des filaments est observée entre les différentes tauopathies. Dans la maladie d'Alzheimer, les

six isoformes de tau sont présentes (Goedert *et al.*, 1992a), alors que dans la maladie de Pick ou la dégénérescence corticobasale, par exemple, seules les isoformes 3R et 4R respectivement s'agrègent en filaments (Friedhoff *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). De plus, les enchevêtrements neurofibrillaires ne représentent pas toujours la principale ou la seule lésion pathologique des tauopathies. C'est le cas notamment de la maladie d'Alzheimer qui est également caractérisée par des dépôts extracellulaires d'amyloïde  $\beta$  (Buee *et al.*, 2000). La relation entre ces deux types de lésions quant à l'apparition de la maladie fait d'ailleurs l'objet de nombreuses études mais reste encore à déterminer (Davies, 2000; Hardy and Selkoe, 2002).

**Tableau I. Tauopathies neurodégénératives.**

Angiopathie cérébrale amyloïde de la protéine prion
Atrophie systémique multiple
Dégénérescence corticobasale <sup>a</sup>
Démence à grains argyrophiliques <sup>a</sup>
Démence avec enchevêtrements neurofibrillaires diffus et calcification <sup>a</sup>
Démence avec enchevêtrements neurofibrillaires seulement <sup>a</sup>
Démence fronto-temporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17 (FTDP-17) <sup>a</sup>
Démence pugilistique <sup>a</sup>
Dystrophie myotonique
Gliose subcorticale progressive <sup>a</sup>
Maladie d'Alzheimer
Maladie de Creutzfeldt-Jakob
Maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
Maladie de Hallervorden-Spatz
Maladie de Niemann-Pick, type C
Maladie de Pick <sup>a</sup>
Maladie des neurones moteurs « non-Guamanian » avec enchevêtrements neurofibrillaires
Panencéphalite sclérosante subaiguë
Paralysie supranucléaire progressive <sup>a</sup>
Parkinsonisme post-encéphalitique
Sclérose latérale amyotrophique/complexe de Guam parkinsonisme-démence <sup>a</sup>
Syndrome de Down

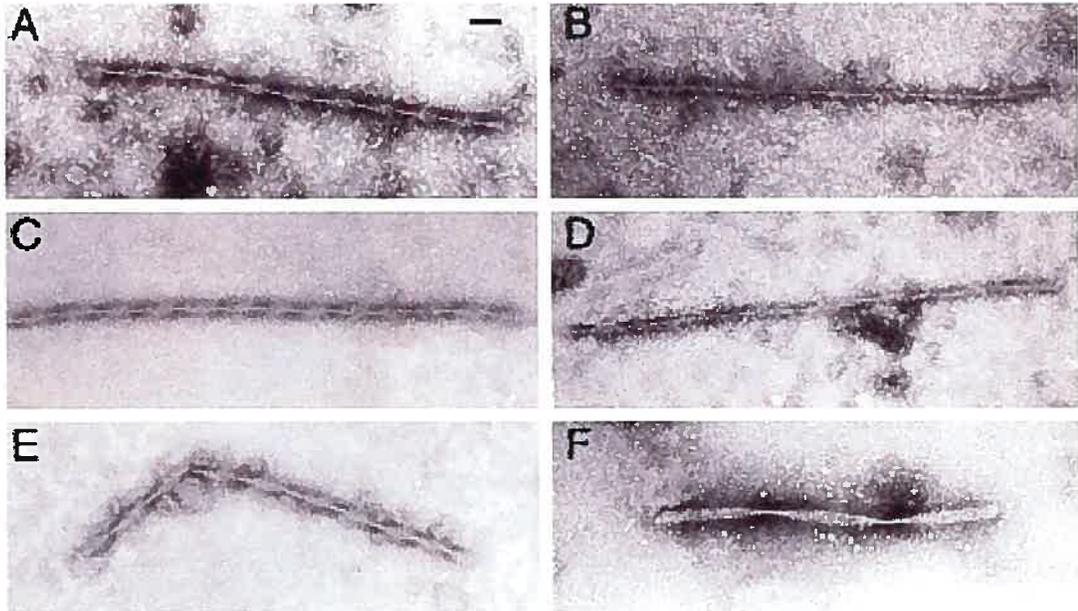
<sup>a</sup>Maladies dont la dégénérescence neurofibrillaire de tau est la lésion neuropathologique prédominante.

Tableau réalisé à partir des articles de revue de Lee *et al.* (2001) et de Trojanowski *et al.* (2002).

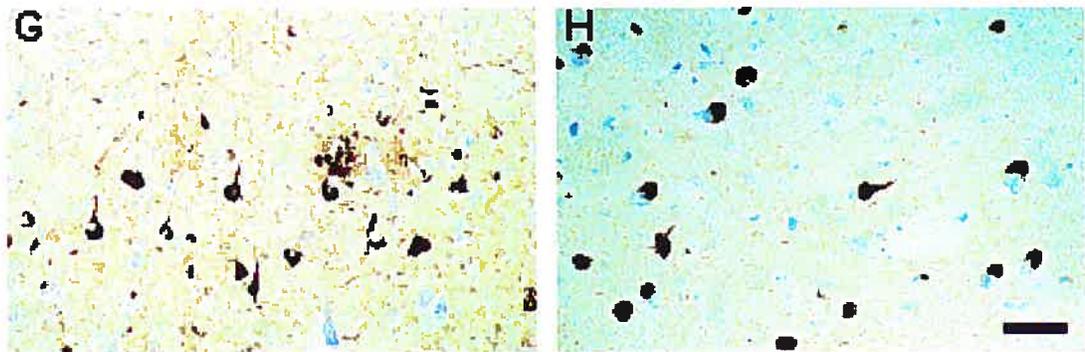
**Figure 4. Allure des filaments et des enchevêtrements neurofibrillaires de tau dans les tauopathies.**

Dans les tauopathies, la protéine tau adopte différents types de structures filamenteuses visibles par microscopie électronique. **A)** Paire de filaments hélicoïdaux (PHF) de la maladie d'Alzheimer. **B)** Filament droit de la paralysie supranucléaire progressive. **C)** PHF du syndrome de Down. **D)** Filament droit de la maladie de Pick. **E)** PHF de la famille Seattle A (FTDP-17). **F)** Filament à l'aspect d'un cordon enroulé de la tauopathie systémique multiple familiale avec démence présénile ou MSTD familiale (FTDP-17). Les filaments de tau s'agrègent pour former des enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) dans le compartiment somato-dendritique des neurones de différentes régions du cerveau. **G)** NFTs de l'hippocampe dans la maladie d'Alzheimer. **H)** NFTs du cortex frontal dans la maladie de Pick. Échelles : 100 nm (A-F) et 80  $\mu\text{m}$  (G-H).

### Filaments de tau



### Enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs)



Modifié de Spillantini et Goedert, 1998, Trends Neurosci. 21: 428-433.



### 1.4.2. Mutations de tau

C'est en 1998 qu'on a démontré sans équivoque que des anomalies affectant la protéine tau suffisent, par elles-mêmes, à provoquer des maladies neurodégénératives, ceci grâce à la découverte de multiples mutations dans le gène de tau chez des patients atteints de démence fronto-temporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17 (FTDP-17) (Clark *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1998; Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998). À ce jour, plus d'une trentaine de mutations ont été identifiées, qui sont de quatre types différents (Goedert, 2004). Les plus nombreuses sont les mutations faux-sens, qui entraînent la substitution d'un acide aminé habituel par un nouveau dans les exons 9 à 13. Viennent ensuite les mutations introniques dans les introns suivant l'exon 9 et surtout l'exon 10. On retrouve également quelques mutations silencieuses dans l'exon 10, c'est-à-dire sans modification aucune de l'acide aminé codé, et enfin, une mutation de délétion où un acide aminé est supprimé. Au niveau fonctionnel, ces mutations forment deux grandes catégories : une où l'effet premier se trouve au niveau de la protéine, à cause d'un changement de la séquence peptidique, l'autre où l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager est altéré, causant alors une augmentation des isoformes 4R (voir les articles de revue de Buee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Goedert, 2004).

Il est toutefois important de souligner que les cas familiaux sont rares comparativement aux tauopathies sporadiques. Ces dernières présentent également des enchevêtrements neurofibrillaires de la protéine tau, mais ne sont pas causées par les mutations mentionnées ci-haut. Il semble cependant que des polymorphismes dans le gène de tau puissent constituer un mécanisme génétique à l'origine des tauopathies sporadiques (Schraen-Maschke *et al.*, 2004).

### 1.4.3. Modèles animaux

L'utilisation de modèles animaux est importante pour tenter d'élucider les mécanismes par lesquels tau est impliquée dans l'apparition et la progression des tauopathies. Ainsi, plusieurs modèles présentant une pathologie liée à tau ont été produits par la surexpression des protéines tau humaines normales ou mutantes.

### 1.4.3.1. *Eucaryotes inférieurs*

Dans une étude réalisée chez le ver *Caenorhabditis elegans* où l'on a exprimé l'isoforme humaine normale de tau (412 acides aminés) ou des formes mutantes (P301L et V337M), un problème de locomotion (mouvements non coordonnés) imputable à une déficience de transmission synaptique a été observé. Par la suite, une accumulation de protéines tau insolubles (agrégats) phosphorylées à plusieurs des mêmes sites que lors des tauopathies a entraîné une neurodégénérescence substantielle. Les lignées exprimant les mutations de tau ont présenté ces mêmes problèmes, mais de façon encore plus sévère. Le fait que les problèmes locomoteurs soient apparus avant même l'agrégation de tau et la perte de neurones a permis de conclure que l'agrégation de la protéine n'est pas responsable du dysfonctionnement neuronal initial induit par tau (Kraemer *et al.*, 2003).

Une protéine tau homologue à celle retrouvée chez l'humain et possédant des fonctions similaires a été identifiée chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Wandosell and Avila, 1987; Heidary and Fortini, 2001). Pour créer un modèle de tauopathies, les formes humaines normale et mutante (R406W) de tau ont été exprimées dans cet organisme (Wittmann *et al.*, 2001). Bien que la toxicité de la protéine tau mutante soit apparue plus élevée, toutes les manifestations suivantes ont également été observées dans le cas de la protéine tau normale : une neurodégénérescence progressive, une accumulation avec l'âge de tau anormale (phosphorylation et conformation anormales) dans les zones de dégénérescence neuronale et une mort prématurée. Cependant, la formation de NFTs était pratiquement exempte de ce modèle. Ceci indique que la neurodégénérescence induite par tau ne requiert pas nécessairement l'agrégation de la protéine en filaments insolubles. Une étude plus récente a cependant démontré que la surexpression de la protéine tau humaine (plus longue isoforme) chez la drosophile pouvait conduire à l'apparition de NFTs et à une neurodégénérescence, suite à l'hyperphosphorylation de cette isoforme par l'homologue drosophile de la kinase GSK-3 $\beta$  lorsque l'expression de cette enzyme est également augmentée (Jackson *et al.*, 2002). Comme il en sera question plus loin, ce modèle a de surcroît permis d'identifier PAR-1/MARK comme la kinase initiatrice de la cascade de phosphorylation conférant une fonction neurotoxique à tau (Nishimura *et al.*, 2004).

La surexpression de l'isoforme fœtale humaine de tau dans les neurones de la *lamproie* entraîne la phosphorylation de ses sites Ser<sup>199/202/396/404</sup> et surtout, induit

l'accumulation somato-dendritique de filaments droits de tau avec le temps, phénomène démontré pour la première fois *in vivo* (Hall *et al.*, 1997). Ces auteurs ont ensuite démontré que ces filaments causaient une perte progressive des microtubules dendritiques et des synapses, et éventuellement une mort neuronale (Hall *et al.*, 2000), leur attribuant ainsi un rôle dans la pathologie associée à la dégénérescence neurofibrillaire (Hall *et al.*, 2002).

#### ***1.4.3.2. Eucaryotes supérieurs***

La souris transgénique est sans aucun doute le modèle animal le plus utilisé pour l'étude des effets neurotoxiques de tau. Ces souris reproduisent de nombreux aspects des tauopathies à la suite de la surexpression d'isoformes humaines normales (Tableau II, p. 27) ou mutantes de tau (Tableau III, p. 28). Les tableaux II et III résument les caractéristiques des divers modèles surexprimant ces protéines. Comme chez la lamproie, le processus d'agrégation pathologique de tau a pu être reproduit *in vivo* chez les souris. Des filaments insolubles apparaissent dans les neurones (et parfois dans les cellules gliales) de toutes les souris qui expriment des formes mutantes de tau et de certaines de celles qui expriment des formes normales. Dans les deux cas, presque toutes les souris développent une expression somato-dendritique de tau hyperphosphorylée, que l'on qualifie de pathologie « pretangle » lorsque les filaments sont néanmoins absents. De plus, les régions du SNC atteintes chez ces souris sont en général les mêmes que celles affectées dans les tauopathies humaines, comme le cortex cérébral, l'hippocampe ou la moelle épinière (ME). Les effets neurotoxiques sont cependant observés à des niveaux protéiques de tau généralement plus faibles chez les souris transgéniques exprimant des formes mutantes que chez celles qui expriment des formes normales de la protéine tau humaine.

Il existe également des souris double et triple (Oddo *et al.*, 2003) transgéniques qui expriment des formes mutantes de tau en combinaison avec d'autres protéines humaines (p25,  $\alpha$ -synucléine mutante, APP mutante, PS1 mutante) et qui développent des phénotypes typiques de ces maladies, incluant la formation de filaments de tau hyperphosphorylée et une neurodégénérescence (voir les articles de revue de Gotz (2001) et de Goedert (2004)). Enfin, une autre stratégie pouvant générer des modèles de tauopathies est de surexprimer des kinases responsables de l'hyperphosphorylation de tau (Avila *et al.*, 2004).

Tableau II. Souris transgéniques exprimant des isoformes normales de la protéine tau humaine.

Isoformes	Promoteur <sup>b</sup>	Niveau d'expression	Hyper-P <sup>c</sup>	Filaments (NFTs)	Localisation neuronale	Régions du SNC	Références
352 a.a. (3R/0N) <sup>a</sup>	HMG-CoA réductase (souris) PrP (souris)	14% du niveau total de tau 5-10X le niveau endogène de souris	Oui Oui	Non Oui	Somato-dend. <sup>c</sup> (+ astrocytes) Somato-dend.	Cerveau surtout, ME <sup>c</sup> Cerveau, ME	(Brion <i>et al.</i> , 1999) (Ishihara <i>et al.</i> , 1999, 2001)
352+381+410 a.a. (3R-0N, 1N, 2N)	Tα1 de α-tubuline (souris)	5,5X le niveau endogène de souris	Oui	Oui, dans gliales	?, Cellules gliales	Cerveau, ME	(Higuchi <i>et al.</i> , 2002)
441 a.a. <sup>c</sup> (4R/2N)	Thy1 (humain) Thy1.2 (souris) Thy1.2 (souris) Thy1.2 (souris) PDGF-β (souris)	10% du niveau total (mais 5X + d'ARNm) 1,5-4X le niveau endogène de souris 1,5X (cerveau), >10X (ME) ~30% du niveau total de tau	Oui Oui Oui ?	Non Non Non Non	Somato-dend. Somato-dend. Somato-dend. ?	Cerveau (ME ?) Cerveau, ME ME surtout, cerveau Cerveau (ME ?)	(Gotz <i>et al.</i> , 1995) (Spittaels <i>et al.</i> , 1999) (Probst <i>et al.</i> , 2000) (Tanemura <i>et al.</i> , 2001)
441 a.a. + 115 pb du 3' UTR	PrP (souris) Thy1 (humain)	8-10X le niveau endogène de souris 1,3X le niveau endo., 59% du niveau total	Non (P seul.) Oui	Parfois (âge avancé) Parfois	Partout Somato-dend.	Cerveau, ME Cerveau, ME	(Zhang <i>et al.</i> , 2004) (Duff <i>et al.</i> , 2000)
Tau génomique, les 6 isoformes	Tau (souris)	2,6-3,7X tau endo., 78-86% du tau total	Oui	Non	Dendrites et axone seul.	Cerveau surtout, ME	(Duff <i>et al.</i> , 2000)
Tau génomique + KO <sup>c</sup> tau souris	Tau (souris)	? (haut niveau de 3R)	Oui	Oui	Somato-dend.	Cerveau surtout, ME	(Andorfer <i>et al.</i> , 2003)

<sup>a</sup>Isoforme de tau à 3 séquences répétées (3R) dans le domaine de liaison aux MTs et sans aucun des inserts en N-terminal (0N).

<sup>b</sup>Pour le nom complet des promoteurs, voir la liste des abréviations (p. xi).

<sup>c</sup>HyperP = hyperphosphorylation, somato-dend. = somato-dendritique, ME = moelle épinière, a.a. = acides aminés, KO = « knock-out ».

Tableau III. Souris transgéniques exprimant des isoformes mutantes de la protéine tau humaine.

Mutations	Isoformes	Promoteur <sup>c</sup>	Niveau d'expression	Hyper-P <sup>d</sup>	Filaments (NFTs)	Localisation neuronale	Régions du SNC	Références
P301S <sup>a</sup>	383 a.a. (4R/0N) <sup>b</sup>	Thy1.2 (souris)	2X le niveau endogène de souris	Oui	Oui	Somato-dend.	Cerveau, ME <sup>d</sup>	(Allen <i>et al.</i> , 2002)
	383 a.a. (4R/0N) <sup>d</sup>	PrP (souris)	Similaire au niveau endogène de souris	Oui	Oui (et dans gliales)	Somato-dend. (+ cellules gliales)	Cerveau, ME	(Lewis <i>et al.</i> , 2000; Lin <i>et al.</i> , 2003; Sahara <i>et al.</i> , 2002)
P301L	441 a.a. (4R/2N)	PrP (souris)	?	Oui	Oui	?	Cerveau, ME	(Lin <i>et al.</i> , 2003)
	441 a.a. (4R/2N)	Thy1.2 (souris)	70% du niveau total de tau	Oui	Oui	Somato-dend.	Cerveau, ME	(Gotz <i>et al.</i> , 2001a)
G272V	441 a.a. (4R/2N)	PrP (souris)	2-3X le niveau endogène (ME)	Oui	Oui (et dans oligo. <sup>h</sup> )	Somato-dend. (+ oligo.)	Cerveau, ME	(Gotz <i>et al.</i> , 2001b)
	441 a.a. (4R/2N)	CaMKII (souris)	? (niveau modéré)	Oui	Oui	Somato-dend.	Cerveau surtout ME	(Tatebayashi <i>et al.</i> , 2002)
R406W	441 a.a. (4R/2N)	PrP (souris)	8-10X le niveau endogène de souris	Non	Oui (et dans astrocytes)	Somato-dend. (+ astrocytes)	Cerveau, ME	(Zhang <i>et al.</i> , 2004)
	441 a.a. (4R/2N)	Thy1.2 (souris)	1, 1-2, 5X le niveau endogène de souris	Oui	Oui	Somato-dend.	Cerveau surtout ME	(Lim <i>et al.</i> , 2001)
V337M	441 a.a. (4R/2N)	PDGF-β (souris)	<10% du niveau total (70% ds hippocampe)	Oui	Oui	Somato-dend.	Cerveau (ME ?)	(Tanemura <i>et al.</i> , 2001, 2002)

<sup>a</sup>L'acide aminé proline (P) en position 301 (selon l'isoforme de 441 résidus) est muté en sérine (S).

<sup>b</sup>Isoforme de tau à 4 séquences répétées (4R) dans le domaine de liaison aux MTs et sans aucun des inserts en N-terminal (0N).

<sup>c</sup>Pour le nom complet des promoteurs, voir la liste des abréviations (p. xi).

<sup>d</sup>HyperP = hyperphosphorylation, ME = moelle épinière, a.a. = acides aminés, oligo. = oligodendrocytes.

## 1.5. LA PHOSPHORYLATION DE TAU

### 1.5.1. Sites de phosphorylation

Depuis 20 ans déjà, il est connu que la protéine tau existe aussi bien à l'état déphosphorylé que phosphorylé dans le cerveau (Lindwall and Cole, 1984a). D'ailleurs, la phosphorylation constitue probablement la principale modification post-traductionnelle de cette protéine. Dans la plus longue isoforme de tau du SNC (441 acides aminés), on compte 85 sites de phosphorylation potentiels, c'est-à-dire des sérines (Ser), des thréonines (Thr) ou des tyrosines (Tyr) (Avila *et al.*, 2004). Parmi ceux-ci, plus d'une quarantaine ont été identifiés, ainsi que les kinases impliquées dans leur phosphorylation (Tableau IV, p. 30). La majorité de ces sites sont suivis par une proline (Pro) et sont en général phosphorylés par des kinases dirigées contre les motifs Ser-Pro et Thr-Pro (« proline-directed protein kinases » ou PDPK) (Buee *et al.*, 2000). Un certain nombre ne sont cependant pas des sites Ser/Thr-Pro et les kinases qui les phosphorylent sont donc regroupées sous le terme « non PDPK » (« non-proline-directed protein kinases ») (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995a). Bien que la plupart des études portent sur les résidus Ser et Thr, certaines sont désormais orientées vers la phosphorylation de résidus Tyr, comme la Tyr<sup>29</sup> (Williamson *et al.*, 2002) ou la Tyr<sup>18</sup>, qui est phosphorylée par la kinase fyn (Lee *et al.*, 2004).

### 1.5.2. Au niveau du développement

La phosphorylation de tau est régulée au cours du développement. L'isoforme fœtale est en effet beaucoup plus phosphorylée dans le SNC embryonnaire que chez l'adulte (Kanemaru *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1993). De plus, le degré de phosphorylation des six isoformes de tau diminue avec l'âge, probablement par suite de l'activation de phosphatases telles que PP2A et PP2B (« protein phosphatase 2A et 2B ») (Mawal-Dewan *et al.*, 1994). Les protéines tau fœtales contiendraient en moyenne 7 moles de phosphate par mole de tau (Kenessey and Yen, 1993), alors que les protéines tau adultes en contiendraient entre 1,9 et 2,8 moles (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992; Kopke *et al.*, 1993). Plusieurs sites de la protéine sont donc phosphorylés au cours du développement, mais ne le sont plus ou beaucoup moins chez l'adulte (Bramblett *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1993; Jicha *et al.*, 1997). On a d'ailleurs démontré qu'une rapide régulation à la baisse de la

Tableau IV. Sites phosphorylés de la protéine tau humaine et kinases impliquées.

Kinases	Sites de phosphorylation
<b>PDPK :</b>	
Cdc2 (Cdk1) <sup>a</sup>	Thr <sup>50b</sup> , Ser <sup>195</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Thr <sup>212</sup> , Thr <sup>231</sup> , Ser <sup>235</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>404</sup>
Cdk2	Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>404</sup>
Cdk5	Thr <sup>153</sup> , Ser <sup>195</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Thr <sup>212</sup> , Ser <sup>214</sup> , Thr <sup>231</sup> , Ser <sup>235</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>404</sup>
DYRK	Thr <sup>212</sup>
MAPK (Erk1/2)	Ser <sup>46</sup> , Thr <sup>50</sup> , Thr <sup>69</sup> , Thr <sup>153</sup> , Thr <sup>175</sup> , Thr <sup>181</sup> , Ser <sup>199</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>212</sup> , Thr <sup>217</sup> , Thr <sup>231</sup> , Ser <sup>235</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>404</sup> , Ser <sup>422</sup>
GSK-3 $\alpha$	Ser <sup>184</sup> , Ser <sup>199</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>212</sup> , Thr <sup>231</sup> , Ser <sup>235</sup> , Ser <sup>262</sup> , Ser <sup>324</sup> , Ser <sup>356</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>404</sup>
GSK-3 $\beta$	Ser <sup>46</sup> , Thr <sup>50</sup> , Thr <sup>69</sup> , Thr <sup>153</sup> , Thr <sup>175</sup> , Thr <sup>181</sup> , Ser <sup>184</sup> , Ser <sup>195</sup> , Ser <sup>198</sup> , Ser <sup>199</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Ser <sup>208</sup> , Thr <sup>212</sup> , Ser <sup>214</sup> , Thr <sup>217</sup> , Thr <sup>231</sup> , Ser <sup>235</sup> , Ser <sup>262</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>400</sup> , Thr <sup>403</sup> , Ser <sup>404</sup> , Ser <sup>413</sup>
SAPK1g/JNK	Thr <sup>153</sup> , Thr <sup>175</sup> , Thr <sup>181</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Thr <sup>212</sup> , Thr <sup>217</sup> , Thr <sup>231</sup> , Ser <sup>235</sup> , Ser <sup>356</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>422</sup>
SAPK2a/P38 $\alpha$	Ser <sup>46</sup> , Thr <sup>153</sup> , Thr <sup>175</sup> , Thr <sup>181</sup> , Ser <sup>185</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Thr <sup>212</sup> , Thr <sup>217</sup> , Ser <sup>235</sup> , Thr <sup>245</sup> , Ser <sup>356</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>422</sup>
SAPK2b/P38 $\beta$	Ser <sup>46</sup> , Thr <sup>153</sup> , Thr <sup>175</sup> , Thr <sup>181</sup> , Ser <sup>185</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Thr <sup>212</sup> , Thr <sup>217</sup> , Ser <sup>235</sup> , Thr <sup>245</sup> , Ser <sup>356</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>422</sup>
SAPK3/P38 $\gamma$	Ser <sup>46</sup> , Thr <sup>153</sup> , Thr <sup>175</sup> , Thr <sup>181</sup> , Ser <sup>185</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Thr <sup>212</sup> , Thr <sup>217</sup> , Thr <sup>231</sup> , Ser <sup>235</sup> , Thr <sup>245</sup> , Ser <sup>356</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>404</sup> , Ser <sup>422</sup>
SAPK4	Thr <sup>153</sup> , Thr <sup>181</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Thr <sup>212</sup> , Thr <sup>217</sup> , Thr <sup>231</sup> , Ser <sup>235</sup> , Thr <sup>245</sup> , Ser <sup>356</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>404</sup>
Tau-tubuline kinase	Ser <sup>208</sup> , Ser <sup>210</sup>
ROCK	Thr <sup>245</sup> , Ser <sup>262</sup> , Thr <sup>377</sup> , Ser <sup>409</sup>
<b>Non PDPK :</b>	
CaMKII	Ser <sup>262</sup> , Ser <sup>285</sup> , Ser <sup>356</sup> , Ser <sup>409</sup> , Ser <sup>416</sup> , Ser <sup>422</sup>
Casein kinase I	Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>404</sup>
Casein kinase II	Thr <sup>39</sup> , Ser <sup>396</sup> , Ser <sup>404</sup>
MARK (p110 mapk)	Ser <sup>262</sup> , Ser <sup>293</sup> , Ser <sup>305</sup> , Ser <sup>320</sup> , Ser <sup>324</sup> , Ser <sup>356</sup>
PKA	Ser <sup>195</sup> , Ser <sup>198</sup> , Ser <sup>202</sup> , Thr <sup>205</sup> , Thr <sup>212</sup> , Ser <sup>214</sup> , Thr <sup>245</sup> , Ser <sup>262</sup> , Ser <sup>293</sup> , Ser <sup>305</sup> , Ser <sup>320</sup> , Ser <sup>324</sup> , Ser <sup>356</sup> , Ser <sup>409</sup> , Ser <sup>416</sup> , Ser <sup>422</sup>
PKB/AKT	Ser <sup>214</sup>
PKC	Ser <sup>258</sup> , Ser <sup>293</sup> , Ser <sup>305</sup> , Ser <sup>320</sup> , Ser <sup>324</sup> , Thr <sup>377</sup>
PKN	Ser <sup>258</sup> , Ser <sup>320</sup> , Ser <sup>352</sup>
PK35/41	Ser <sup>262</sup> , Ser <sup>293</sup> , Ser <sup>324</sup> , Ser <sup>409</sup>
Phosphorylase kinase	Ser <sup>237</sup> , Ser <sup>262</sup> , Ser <sup>285</sup> , Ser <sup>305</sup> , Ser <sup>352</sup> , Ser <sup>356</sup>
PHFs kinase	Thr <sup>361</sup> , Ser <sup>412</sup>

<sup>a</sup>Pour le nom complet des kinases, voir la liste des abréviations (p. xi).

<sup>b</sup>Numérotation des sérines et des thréonines selon l'isoforme de tau de 441 acides aminés. Tableau réalisé à partir des articles de Billingsley et Kincaid (1997) et de Amano *et al.* (2003), et du site Internet de Luc Buée ([www.lille.inserm.fr/u422/TauLuc.html](http://www.lille.inserm.fr/u422/TauLuc.html)).

phosphorylation à certains sites coïncide avec la transition de l'isoforme immature de tau vers les isoformes adultes (Rosner *et al.*, 1995). De plus, la phosphorylation de tau est associée aux premiers stades du développement axonal dans le SNC du poulet (Pope *et al.*, 1993), et dans des cellules Sf9, le développement des prolongements induit par tau nécessite la phosphorylation de ses résidus Ser<sup>262</sup> et Ser<sup>356</sup> (Biernat and Mandelkow, 1999). Enfin, la phosphorylation de tau par la kinase MARK semble importante dans l'établissement de la polarité neuronale (Drewes *et al.*, 1998).

La plupart des études ci-haut mentionnées ont été réalisées à l'aide d'anticorps dépendants de la phosphorylation, qui reconnaissent un épitope particulier de tau dans son état phosphorylé ou non. Ces anticorps ont également permis de constater que l'état de phosphorylation de tau diffère dans les divers compartiments cellulaires des neurones au cours de leur développement. Grâce à l'utilisation de l'anticorps Tau-1, qui reconnaît un épitope déphosphorylé de tau, on a noté qu'au stade 3 du développement des neurones de l'hippocampe en culture, le marquage est concentré au niveau de l'extrémité distale de l'axone (Mandell and Banker, 1996a). La présence de ce gradient proximo-distal signifie que tau est de plus en plus déphosphorylée vers l'extrémité axonale ou, autrement dit, que la phosphorylation de tau à l'épitope reconnu par Tau-1 diminue le long de l'axone. À la suite d'un traitement à la phosphatase, ces auteurs ont constaté l'apparition d'un marquage de tau aussi intense dans tous les compartiments cellulaires, alors qu'un traitement avec des kinases abolit complètement ce marquage. Au contraire, l'utilisation d'un anticorps spécifique d'un épitope phosphorylé conduit au résultat opposé. Ces auteurs suggèrent donc la possibilité que le gradient de phosphorylation de tau puisse être impliqué dans l'établissement de la polarité neuronale. Le traitement de tissus à la phosphatase a également montré une quantité significative de tau phosphorylé à l'épitope de Tau-1 dans le compartiment somato-dendritique des neurones du SNC chez le rat (Papasozomenos and Binder, 1987), de même que dans le cervelet de chats, bien que l'intensité de la phosphorylation diminuait alors durant le développement postnatal (Riederer and Binder, 1994). L'utilisation d'anticorps dépendants de la phosphorylation démontre donc clairement que, bien que préférentiellement axonale comparativement aux autres MAPs, la protéine tau n'est pas exclusivement axonale et que sa distribution cellulaire est liée à la phosphorylation. Ces anticorps s'avèrent donc des outils très importants pour la caractérisation de l'état de phosphorylation de tau.



### 1.5.3. Au niveau pathologique

Comme il a été décrit plus tôt, les tauopathies sont caractérisées par des agrégations de la protéine tau hyperphosphorylée, les NFTs composés de PHFs. Des études ont démontré qu'une accumulation de la protéine tau phosphorylée précéderait la formation des NFTs (Baner *et al.*, 1989; Braak *et al.*, 1994). La phosphorylation anormale de tau pourrait donc être un événement clé dans la transformation en PHFs de cette protéine humaine normale et, conséquemment, dans le développement des tauopathies (Lee *et al.*, 1991; Lee and Trojanowski, 1992). D'ailleurs, plusieurs sites reconnus pour être phosphorylés dans les PHFs ne le sont pas chez la protéine tau normale de l'humain (Hasegawa *et al.*, 1992) ou du rat adulte (Watanabe *et al.*, 1993). Cependant, l'état de phosphorylation de tau dans les PHFs ressemble à celui de la protéine tau fœtale humaine ou de rat (Bramblett *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1993). Morishima-Kawashima *et al.* (1995) ont identifié 19 sites phosphorylés dans les PHFs chez le rat et la moitié seulement de ces sites étaient également phosphorylés chez la protéine tau fœtale. Ainsi, bien qu'une similarité existe entre la phosphorylation des protéines tau fœtales et celles des PHFs, il est clair que ces dernières le sont davantage (Lovestone and Reynolds, 1997).

#### 1.5.3.1. Conséquences de l'hyperphosphorylation

L'hyperphosphorylation de tau entraîne plusieurs changements de sa conformation et de sa fonction au sein du neurone. En effet, la protéine tau devient alors plus longue et plus rigide (Hagestedt *et al.*, 1989). De plus, une phosphorylation dans sa région C-terminale, aux sites Ser<sup>396</sup> et Ser<sup>422</sup> par exemple, causerait une augmentation de son agrégation (Abraha *et al.*, 2000; Haase *et al.*, 2004). Une autre étude montre que l'hyperphosphorylation de tau conduit, sous certaines conditions, à son assemblage en NFTs constitués de PHFs et de filaments droits (Alonso *et al.*, 2001).

La phosphorylation de tau dans sa portion C-terminale, par la PKA par exemple, entraîne également une réduction de sa dégradation en raison d'une augmentation de sa résistance au clivage par les protéases « calpain », ce qui pourrait ainsi contribuer à son accumulation dans la cellule (Johnson, 1992; Litersky and Johnson, 1992, 1995). On a également démontré que la protéine tau associée aux PHFs est extrêmement résistante à la dégradation protéolytique comparativement aux protéines tau fœtales et adultes du cerveau

(Yang and Ksiezak-Reding, 1995). Une fonction importante des neurones serait altérée par l'accumulation de la protéine tau. Il semble que le transport axonal antérograde (vers l'extrémité distale de l'axone) des organelles (mitochondries, réticulum endoplasmique, peroxisomes), des neurofilaments et des vésicules golgiennes le long des MTs est inhibé par une accumulation de tau, ce qui entraînerait une perte des synapses, une augmentation du stress oxydatif et finalement une dégénérescence neuronale (Ebner *et al.*, 1998; Stamer *et al.*, 2002; Mandelkow *et al.*, 2003).

Au niveau du cytosquelette, l'efficacité de tau à promouvoir la polymérisation et l'assemblage des MTs est diminuée par la phosphorylation, en raison d'une perte d'affinité pour ceux-ci (Lindwall and Cole, 1984b; Drechsel *et al.*, 1992). D'ailleurs, la phosphorylation des sites Ser<sup>396</sup>, Thr<sup>231</sup> et surtout Ser<sup>262</sup> réduit dramatiquement la liaison de tau avec les MTs (Biernat *et al.*, 1993; Bramblett *et al.*, 1993; Sengupta *et al.*, 1998). Cependant, cette capacité à induire la polymérisation de la tubuline ne serait pas aussi affectée par la phosphorylation chez la protéine tau fœtale que chez celle des PHFs, bien que les deux protéines possèdent plusieurs épitopes phosphorylés en commun (Yoshida and Ihara, 1993).

L'interaction de tau avec la membrane plasmique est également affectée par la phosphorylation. En effet, il semble que cette association dépendrait d'une déphosphorylation au site de l'anticorps Tau-1, situé dans la région riche en proline (Arrasate *et al.*, 2000). De plus, une étude réalisée avec des mutants de tau qui miment l'hyperphosphorylation rencontrée dans les PHFs montre une abolition complète de leur association avec la membrane plasmique (Maas *et al.*, 2000).

Il existe également un lien entre l'hyperphosphorylation de tau et la mort neuronale. On a effectivement noté une augmentation de la phosphorylation de la protéine tau lors de l'apoptose et plusieurs des sites hyperphosphorylés durant ce processus le sont également dans la maladie d'Alzheimer (Zhang and Johnson, 2000). Plus récemment, il a été suggéré que les sites de phosphorylation de tau situés dans les régions 159-163 et 202-205 soient associés avec l'apoptose neuronale et que les changements apoptotiques résultent d'une phosphorylation anormale de tau (Kobayashi *et al.*, 2003).

### 1.5.3.2. Kinases et phosphatases impliquées

En condition normale, la phosphorylation de tau est bien régulée par l'action contrôlée des kinases et des phosphatases. Cependant, la balance entre celles-ci serait dérégulée dans les tauopathies et une hyperphosphorylation anormale de tau pourrait alors apparaître, autant d'une augmentation de l'activité kinasique que d'une diminution de celle des phosphatases (Gong *et al.*, 1995; Mandelkow *et al.*, 1995; Trojanowski and Lee, 1995).

Plusieurs études ont impliqué les kinases GSK-3 $\beta$  et Cdk5, abondantes dans les neurones, dans la régulation de la phosphorylation de tau *in vivo*. La transfection de cellules non neuronales avec la protéine tau humaine et GSK-3 $\beta$  induit une hyperphosphorylation de tau et une perte de sa liaison aux MTs (Lovestone *et al.*, 1996). Au contraire, l'inactivation de cette kinase par le lithium réduit la phosphorylation de tau dans des cultures de neurones (Hong *et al.*, 1997) et prévient même son hyperphosphorylation aux sites impliqués dans l'Alzheimer dans des neurones traités avec un inhibiteur de phosphatases (Munoz-Montano *et al.*, 1997). Des souris transgéniques qui surexpriment GSK-3 $\beta$  montrent une hyperphosphorylation de tau dans les neurones de l'hippocampe, son accumulation dans le compartiment somato-dendritique et une neurodégénérescence (Lucas *et al.*, 2001). De plus, cette kinase est associée avec les PHFs de tau (Mandelkow *et al.*, 1992) et certaines données l'impliqueraient dans la formation de ces PHFs (Pei *et al.*, 1999), ce qui a par la suite été confirmé par une étude chez la drosophile (Jackson *et al.*, 2002).

Comme GSK-3 $\beta$ , Cdk5 est une kinase associée aux MTs qui contribue à la phosphorylation anormale de tau (Baumann *et al.*, 1993) et qu'on retrouve au niveau des NFTs (Yamaguchi *et al.*, 1996). Pour être active, Cdk5 doit s'associer avec sa sous-unité régulatrice, p35 (Tsai *et al.*, 1994). Cependant, p35 peut être clivée et générer une forme tronquée, p25 (Nath *et al.*, 2000), qui s'accumule dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et qui active Cdk5 de façon constitutive. De plus, l'expression du complexe p25/Cdk5 dans les cellules cause une hyperphosphorylation de tau, réduit sa capacité à se lier aux MTs, induit un effondrement du cytosquelette et finalement l'apoptose (Patrick *et al.*, 1999). On a d'ailleurs démontré que l'activité de Cdk5 est significativement augmentée durant l'apoptose, de même que son association avec tau (Zhang and Johnson, 2000). En croisant des souris transgéniques qui surexpriment p25

avec d'autres qui surexpriment la forme mutante P301L de tau, des chercheurs ont observés une hyperphosphorylation de tau, une accumulation significative d'agrégats de tau et une hausse du nombre de NFTs (Noble *et al.*, 2003). Cette kinase semble donc jouer un rôle important dans la pathogenèse des tauopathies.

Il semble que la phosphorylation de tau dans les PHFs doive se faire selon une certaine séquence. Premièrement, les Ser<sup>199,202</sup> et Thr<sup>205</sup> seraient phosphorylées, suivi de la Thr<sup>212</sup> par la kinase GSK-3 $\beta$ , puis de la Ser<sup>214</sup> par la PKA. D'ailleurs, si la Ser<sup>214</sup> est phosphorylée en premier, cela empêche la phosphorylation des autres sites (Zheng-Fischhofer *et al.*, 1998). De plus, la phosphorylation de tau par Cdk5 stimule sa phosphorylation subséquente par GSK-3 $\beta$  (Sengupta *et al.*, 1997) et cette séquence serait essentielle pour que la phosphorylation par GSK-3 $\beta$  cause une perte de l'association de tau avec les MTs (Cho and Johnson, 2003). Tout récemment, on a découvert que la kinase PAR-1 de la drosophile, dont l'homologue chez les mammifères est la kinase MARK, joue un rôle d'initiateur dans ce processus de phosphorylation ordonné dans le temps qui confère à la protéine tau une toxicité (Nishimura *et al.*, 2004). Il était déjà connu que la surexpression de MARK dans les cellules entraînait une hyperphosphorylation des MAPs, dont tau, et un effondrement du réseau microtubulaire (Drewes *et al.*, 1997; Jenkins and Johnson, 2000). Nishimura *et al.* (2004) ont maintenant démontré que la phosphorylation des résidus Ser<sup>262</sup> et Ser<sup>356</sup> de tau par PAR-1 est nécessaire pour que GSK-3 $\beta$  et Cdk5 puissent phosphoryler plusieurs autres sites et causer une dégénérescence liée à l'hyperphosphorylation de tau. En abolissant la fonction de PAR-1 directement ou en mutant ses sites de phosphorylation de tau (Ser<sup>262/356</sup>) de façon à ce qu'ils ne puissent plus être phosphorylés, ils observent une réduction dramatique de la phosphorylation globale de tau et de ses effets neurotoxiques. Cette diminution est d'ailleurs nettement plus importante que celle observée lorsqu'ils mutent la Ser<sup>202</sup>, un site de GSK-3 $\beta$  et de Cdk5, confirmant ainsi le rôle initiateur joué par PAR-1 dans le processus d'hyperphosphorylation de tau.

Il semble évident que l'hyperphosphorylation de tau représente un aspect crucial des tauopathies, mais le moment et la façon dont elle intervient dans l'apparition de ces maladies neurodégénératives ne sont pas encore établis clairement. Nous nous sommes donc penchés sur la question et avons tenté d'éclaircir une partie de la séquence des événements impliquant la phosphorylation de tau dans ces maladies.

## 1.6. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

Tel que mentionné plus tôt, tau est une protéine soluble enrichie au niveau de l'axone des neurones adultes (Binder *et al.*, 1985; Black *et al.*, 1996), alors qu'elle s'accumule dans le corps cellulaire et les dendrites au cours des tauopathies. Elle adopte alors un état anormalement phosphorylé et s'agrège sous forme de filaments insolubles (Lee *et al.*, 2001). L'hypothèse la plus acceptée actuellement pour expliquer le rôle de tau dans les tauopathies fait référence au fait que l'hyperphosphorylation de tau diminue son affinité de liaison aux MTs. Ainsi, les protéines tau hyperphosphorylées se détacheraient des MTs de l'axone, s'accumuleraient dans le corps cellulaire et les dendrites, où elles s'agrègeraient pour former des filaments insolubles et éventuellement des NFTs toxiques pour le neurone. Cette hypothèse est cependant encore loin d'être démontrée. D'ailleurs, plusieurs études réalisées avec des modèles animaux ont montré que la neurodégénérescence induite par tau ne requiert pas absolument son agrégation en filaments et que son accumulation somato-dendritique sous une forme hyperphosphorylée est suffisante pour causer une toxicité cellulaire (voir l'introduction).

L'objectif de la présente étude était donc de vérifier si la phosphorylation aberrante de tau rencontrée au cours des tauopathies neurodégénératives est bel et bien responsable de son accumulation dans le compartiment somato-dendritique du neurone. Pour ce faire, nous avons muté les uns après les autres plusieurs sites de la protéine tau humaine reconnus pour être phosphorylés lorsqu'une altération de sa distribution a lieu au sein du neurone, c'est-à-dire les sérines et thréonines suivantes : Ser<sup>199</sup>, Ser<sup>202</sup>, Thr<sup>205</sup>, Thr<sup>212</sup>, Ser<sup>214</sup>, Thr<sup>231</sup>, Ser<sup>235</sup>, Ser<sup>262</sup>, Ser<sup>356</sup>, Ser<sup>396</sup>, Ser<sup>400</sup>, Ser<sup>404</sup>, Ser<sup>409</sup> et Ser<sup>422</sup> (Figure 5, p. 38). Une phosphorylation des protéines tau s'accumulant dans le compartiment somato-dendritique a été identifiée chez tous ces acides aminés (Buee *et al.*, 2000). D'ailleurs, les sites Ser<sup>214</sup>, Thr<sup>231</sup> et Ser<sup>396</sup> sont les acides aminés phosphorylés le plus souvent reconnus au sein des NFTs et les paires Thr<sup>212</sup>/Ser<sup>214</sup> et Thr<sup>231</sup>/Ser<sup>235</sup> sont des sites uniques aux NFTs de tau lorsqu'ils sont phosphorylés simultanément (Hoffmann *et al.*, 1997).

Grâce à une technique de mutagenèse dirigée, deux formes mutantes ont été générées pour chacun de ces sites. Ils ont d'une part été convertis en alanine pour créer une forme ne pouvant être phosphorylée et d'autre part, en acide glutamique (glutamate), un acide aminé qui introduit une charge négative et un changement conformationnel qui

**Figure 5. Sites de phosphorylation de la protéine tau mutés en alanine et en glutamate au cours de la présente étude.**

Tous les acides aminés de tau à muter sont des sérines (S) ou des thréonines (T), qui seront converties en glutamate pour mimer la phosphorylation et en alanine, une forme non phosphorylable. Ceux-ci sont identifiés par un chiffre, qui représente la position de l'acide aminé sur le gène. Cette numérotation se fait par rapport à la plus longue isoforme humaine de tau, soit celle de 441 acides aminés. Presque tous les sites à muter sont situés de part et d'autre des quatre séquences répétées (R1 à R4, en vert). Le plus gros des mutants de tau produit contient 12 sites mutés, c'est-à-dire tous ces sites sauf les acides aminés T212 et S422.



miment la phosphorylation (Haase *et al.*, 2004). La pertinence de cette technique a déjà été confirmée par le fait qu'elle reproduit plusieurs des aspects structuraux et fonctionnels typiques des protéines tau hyperphosphorylées (Eidenmuller *et al.*, 2000; Maas *et al.*, 2000). Cette méthode est dorénavant couramment utilisée afin de vérifier les conséquences de la phosphorylation de tau à des sites précis et pour déterminer le rôle potentiel de l'hyperphosphorylation dans les tauopathies (Fath *et al.*, 2002; Amano *et al.*, 2003; Haase *et al.*, 2004).

Pour vérifier notre hypothèse, les mutants ont été exprimés dans des cultures primaires de neurones de l'hippocampe de rats. L'ADNc de tau utilisé pour produire les mutants (383 résidus, 4R/0N) a été fusionné en N-terminal à la GFP afin de les distinguer des formes endogènes de tau. Suite à des marquages immunocytochimiques spécifiques de MAP2 et de tau, pour bien distinguer les divers compartiments cellulaires, une analyse en microscopie à fluorescence a été effectuée pour localiser les protéines tau humaines. Mais dans un premier temps, la distribution et l'état de phosphorylation des protéines tau endogènes ont été caractérisés dans le système cellulaire employé, grâce à l'utilisation d'anticorps dépendants de la phosphorylation.



## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1. PLASMIDES D'EXPRESSION**

L'ADNc de l'isoforme fœtale humaine de 352 acides aminés à 3 répétitions de tau a été fusionné en N-terminal à la GFP (GFP-Tau3R) dans le plasmide pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, CA) et en C-terminal (Tau3R-GFP) dans le plasmide pGFP-C2 de Clontech (Lee *et al.*, 2004). Cette même isoforme a également été fusionnée en N-terminal au « tag » FLAG (Flag-Tau3R), dont la séquence est MDYKDDDDK (Hopp *et al.*, 1988; Prickett *et al.*, 1989), dans le vecteur fpRc/CMV (Leger *et al.*, 1994), une modification de pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA). L'isoforme adulte humaine de 383 acides aminés à 4 répétitions de tau a été fusionnée en N-terminal à la GFP (GFP-Tau4R) dans le plasmide pEGFP-C1 (Lu and Kosik, 2001). Cette même isoforme de Tau4R a également été fusionnée à FLAG en N-terminal (Flag-Tau4R) dans le vecteur fpRc/CMV. Finalement, l'isoforme de rat adulte de 430 acides aminés à 4 répétitions a été insérée dans le plasmide pRc/CMV (Rat-Tau4R). Les constructions GFP-Tau4R et GFP-Tau3R nous ont été fournies par le Dr K. Kosik (Université Harvard, Boston, Massachusetts). Tous les autres plasmides nous ont été gracieusement donnés par le Dr G. Lee (Université d'Iowa, Iowa, IA). Toutes les constructions d'ADN plasmidique utilisées sont résumées dans le tableau V suivant.

**Tableau V. Caractéristiques des différentes constructions d'ADN plasmidique de tau utilisées au cours de cette étude.**

<b>Nom</b>	<b>Nbr de répétitions</b>	<b>Nbr d'acides aminés</b>	<b>Expression</b>	<b>Espèce</b>	<b>Plasmide</b>	<b>Position du tag</b>
GFP-Tau4R*	4	383	adulte	humain	pEGFP-C1	N-terminal
GFP-Tau3R	3	352	fœtale	humain	pEGFP-C1	N-terminal
Tau3R-GFP	3	352	fœtale	humain	pGFP-C2	C-terminal
Flag-Tau3R	3	352	fœtale	humain	fpRc/CMV	N-terminal
Flag-Tau4R	4	383	adulte	humain	fpRc/CMV	N-terminal
Rat-Tau4R	4	430	adulte	rat	pRc/CMV	-

\*Construction d'ADN qui a servi à générer tous les mutants de tau.

## 2.2. MUTAGENÈSE

Les mutants de tau ont été générés à partir du plasmide GFP-Tau4R selon le protocole de Stratagene (La Jolla, CA) « QuikChange® XL site-directed mutagenesis kit », qui consiste en une méthode d'amplification linéaire de l'ADN. Le principe de cette technique est illustré à la figure 6 (p. 43). Cependant, des bactéries DH5 $\alpha$  rendues compétentes ont été utilisées au lieu des bactéries ultra compétentes XL10-Gold et la transformation bactérienne a été faite selon la procédure du manuel technique no 041 de Promega (Madison, WI) « Altered Sites® II Mammalian Mutagenesis System ». Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu LB Agar contenant 30  $\mu$ g/ml de kanamycine. Pour extraire et purifier l'ADN plasmidique, les trousse de QIAGEN (Mississauga, Ontario) « QIAprep® Spin Miniprep Kit » et « QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit » ont été utilisées. Les amorces ont été synthétisées chez Alpha DNA (Montréal, Québec).

Les acides aminés de la protéine tau qui ont été mutés sont les sérines et thréonines suivantes : Ser<sup>199</sup>, Ser<sup>202</sup>, Thr<sup>205</sup>, Thr<sup>212</sup>, Ser<sup>214</sup>, Thr<sup>231</sup>, Ser<sup>235</sup>, Ser<sup>262</sup>, Ser<sup>356</sup>, Ser<sup>396</sup>, Ser<sup>400</sup>, Ser<sup>404</sup>, Ser<sup>409</sup> et Ser<sup>422</sup> (Figure 5, p. 38). Les sites ont tous été mutés les uns après les autres sur la même protéine, générant ainsi un total de 30 mutants. Chaque acide aminé à muter a été converti en deux formes différentes : en alanine (forme non phosphorylable) et en glutamate (forme mimant la phosphorylation). Les mutants ont tous été vérifiés par séquençage automatique (Université Laval, Ste-Foy, Québec et Alethia Biothérapeutiques, Montréal, Québec).

## 2.3. CULTURES CELLULAIRES

Les cellules *Hela* ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco, Invitrogen, Burlington, Ontario) contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS de HyClone, VWR, Ville Mont-Royal, Québec) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco, Invitrogen) à un pH entre 7.2 et 7.5. Elles ont étéensemencées à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules par plat de Pétri de 100 mm et gardées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cultures primaires de *neurones* de l'hippocampe de rat ont été préparées selon le protocole de Goslin *et al.* (1998). Cependant, les neurones n'ont pas été cultivés en co-

culture avec les cellules gliales, mais plutôt dans du milieu Neurobasal (Gibco, Invitrogen) contenant du « B27 serum-free supplement » 1X (Gibco, Invitrogen) et 0,5 mM de L-glutamine (Sigma, Oakville, Ontario), à une densité de 200 000 cellules par plat de Pétri de 60 mm.

## 2.4. TRANSFECTIONS

Les cellules *Hela* ont été transfectées avec GFP, GFP-Tau4R et les différents mutants de tau, à l'aide du « PolyFect® transfection reagent » de QIAGEN. La veille des transfections, les cellules ont étéensemencées à 100 000 cellules par plat de Pétri de 35 mm. La durée de l'expression a été de 24 heures.

Les *neurones* ont été transfectés avec 4 µg d'ADN de toutes les constructions de tau, de même qu'avec les mutants, à l'aide d'un protocole modifié de la méthode au calcium phosphate (Xia *et al.*, 1996; Micheva *et al.*, 2001). L'ADN a été dilué dans un volume final de 60 µL d'eau contenant 7,6 µL de CaCl<sub>2</sub> 2 M. Le tout a été ajouté goutte-à-goutte à 60 µL de HBS 2X (274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 mM D-glucose, 42 mM HEPES, pH 7.07) et laissé 30 minutes à température de la pièce, au noir, pour la formation du complexe. Ce mélange a ensuite été déposé sur 2 lamelles (18 mm) de neurones préalablement placées dans un des puits d'un plateau de 6 puits contenant 1 mL de milieu de culture. Le tout a été remis dans l'incubateur à 37°C pendant 30 minutes. Pour arrêter la transfection, les lamelles de neurones ont été lavées 3 fois avec 3-4 ml d'une solution de HBSS (9,5 g de HBSS H2387 de Sigma et 2,38 g de HEPES dans 1 L d'eau, pH 7.2) à 37°C. Elles ont ensuite été replacées dans leur plat de Pétri d'origine. L'expression protéique a été arrêtée à 3, 6, 9, 12, 24, 48 et 72 heures.

## 2.5. IMMUNOBUVARDAGE

L'expression des formes mutantes a été confirmée par « Western blot ». Pour ce faire, les cellules Hela transfectées ont été grattées dans 100 µL de PBS 1X pH 7.3 (Goslin *et al.*, 1998), contenant 1% IGEPAL et 5 mM EDTA pour en extraire les protéines, puis incubées sur glace pendant 30 minutes pour permettre la lyse cellulaire complète. La solution a ensuite été centrifugée à 14 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C afin de se débarrasser des débris cellulaires. La concentration protéique du surnageant a été

déterminée par dosage selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), à l'aide de la trousse « Bio-Rad  $D_C$  protein assay kit » (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca). Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7,5% et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les standards de poids moléculaires utilisés proviennent de Bio-Rad (« Precision Plus Protein standards »). La protéine tau a été visualisée avec l'anticorps monoclonal 46.1 de souris (généreusement fourni par le Dr V. Lee, Université de Pennsylvanie, Philadelphie, PA), dilué 1/250 dans du PBS 1X contenant 5% de lait. La membrane a aussi été révélée avec l'anticorps monoclonal anti- $\beta$ -tubuline de souris (DSHB, Université d'Iowa, IA) dilué 1/500. Elle a été incubée 1 heure à température de la pièce avec les anticorps primaires. Elle a ensuite été lavée dans le PBS 1X, puis incubée 1 heure avec l'anticorps secondaire dirigé contre les IgG et IgM de souris et couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch Laboratories, Cedarlane Laboratories Limited, Hornby, Ontario). La membrane a été révélée avec le « SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate kit » de PIERCE (MJS BioLynx Inc, Brockville, Ontario).

## 2.6. IMMUNOCYTOCHIMIE

Les neurones ont été fixés avec le paraformaldéhyde 4% dans du PBS contenant 4% de sucrose (Goslin *et al.*, 1998) pendant 45 minutes à 37°C (Mandell and Banker, 1996a), puis perméabilisés 5 minutes avec une solution de 0,2% de Triton X-100 dans du PBS et lavés dans le PBS.

Les neurones non transfectés ont été marqués avec les anticorps polyclonaux PolyTau (1/750), fournis par le Dr V. Lee (Université de Pennsylvanie, Philadelphie, PA), et PolyMAP2 (1/2000) fournis par le Dr R. Vallee (Université Columbia, New York, NY), de même qu'avec les anticorps monoclonaux Tau-1 (1/100) de Chemicon International (Cedarlane Laboratories Limited), AT8 (1/40) de PIERCE (MJS BioLynx Inc), PHF-1 (1/10) et CP13 (1/20), fournis par le Dr P. Davies (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY), et AP20 (1/20) de Neomarkers (Medicorp Inc, Montréal, Québec).

Les neurones transfectés ont également été marqués avec un anticorps contre MAP2, PolyMAP2 ou AP20. Pour les neurones transfectés avec Flag-Tau3R et Flag-Tau4R, les protéines tau humaines ont été visualisées avec l'anticorps monoclonal HT7

(1/40) de PIERCE (MJS BioLynx Inc) et ceux transfectés avec Rat-Tau4R ont été marqués avec PolyTau.

Les anticorps secondaires qui ont été utilisés sont les suivants : anticorps dirigés contre les IgG de souris couplés à la rhodamine (1/500) ou au FITC (1/100), contre les IgG de lapin couplés à la rhodamine (1/1000) ou au FITC (1/100) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Cedarlane Laboratories Limited). Tous ces anticorps ont été dilués dans du PBS contenant 10% de FBS. Les lamelles de neurones ont été préincubées 30 minutes avec le PBS/10% FBS, incubées 1 heure avec les anticorps primaires et secondaires (sauf Tau-1 qui a été incubé toute la nuit) et lavées 3 fois 5 minutes dans le PBS avant et après chaque incubation, le tout à la température de la pièce. Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames de verres dans du Mowiol contenant 1,5% de DABCO (Goslin *et al.*, 1998) et observées avec l'objectif 40X d'un microscope à fluorescence de type Axioplan Zeiss.

### **3. RÉSULTATS**

#### **3.1. PRODUCTION DES MUTANTS**

##### **3.1.1. Stratégie « Altered Sites® II Mammalian Mutagenesis System » de Promega**

La génération des mutants de tau a occupé la majeure partie du temps alloué pour la réalisation de ce projet de maîtrise. Puisque de nombreux sites devaient être mutés, il importait de trouver la technique de mutagenèse la plus efficace et rapide possible. Ainsi, la première méthode utilisée fut celle de Promega (« Altered Sites® II Mammalian Mutagenesis System »), puisqu'elle permet de réaliser des cycles continus de mutagenèse sans recourir au sous-clonage. Ceci est rendu possible grâce au système de sélection à deux antibiotiques du vecteur pALTER®-MAX (Figure 6A, p. 47), dont les résistances peuvent être inactivées et rétablies. L'insert GFP-Tau4R a donc dû être isolé du vecteur pEGFP-C1, grâce à une digestion avec les enzymes de restriction *SnaB* I et *Hpa* I, qui génèrent des extrémités à bouts francs, puis cloné dans pALTER®-MAX au site *Sma* I, également à bouts francs. Dans ce système, qui nécessite une dénaturation alcaline plutôt qu'à la chaleur, un seul des deux gènes de résistance aux antibiotiques doit être actif à la fois. Ainsi, en utilisant des oligonucléotides de réactivation d'une des deux résistances et d'inactivation de la seconde, en même temps que celui contenant la mutation, il devient possible de faire plusieurs cycles de mutagenèse en changeant la sélection à l'antibiotique à chacun des cycles (Figure 6B, p. 47). Bien que très ingénieuse, cette technique s'est malheureusement avérée complètement inefficace, puisque certains oligonucléotides pour rétablir ou inactiver la résistance aux antibiotiques ne fonctionnaient pas.

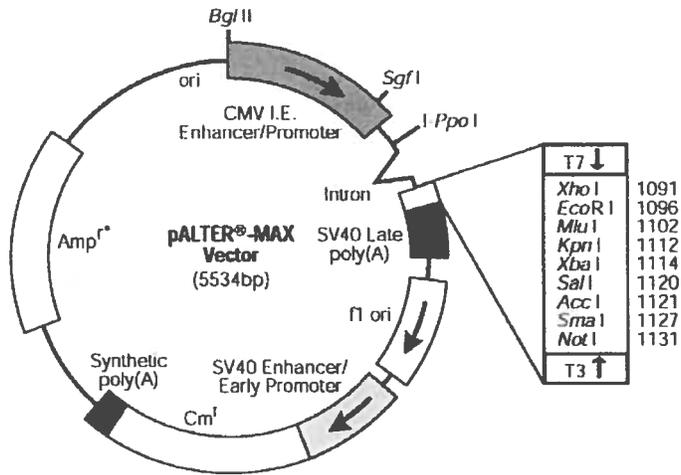
##### **3.1.2. Stratégie impliquant des étapes de PCR et de sous-clonage**

Suite à l'insuccès obtenu avec la stratégie de Promega, nous nous sommes tournés vers une méthode plus conventionnelle, mais plus longue, puisqu'elle impliquait des étapes de PCR et de sous-clonage. Cette stratégie utilisait le plasmide pEGFP-C1 (Figure 7A, p. 50) dans lequel Tau4R avait déjà été cloné aux sites *Bgl* II et *EcoR* I par Lu et Kosik (2001) (Figure 7B, p. 50). Ainsi, on retrouve dans le plasmide (de 5' vers 3') la séquence de la GFP, le début du site de clonage multiple (MCS) jusqu'au site *Bgl* II, suivi par Tau4R qui se termine par le site *EcoR* I, puis la suite du MCS, qui contient entre autres le site

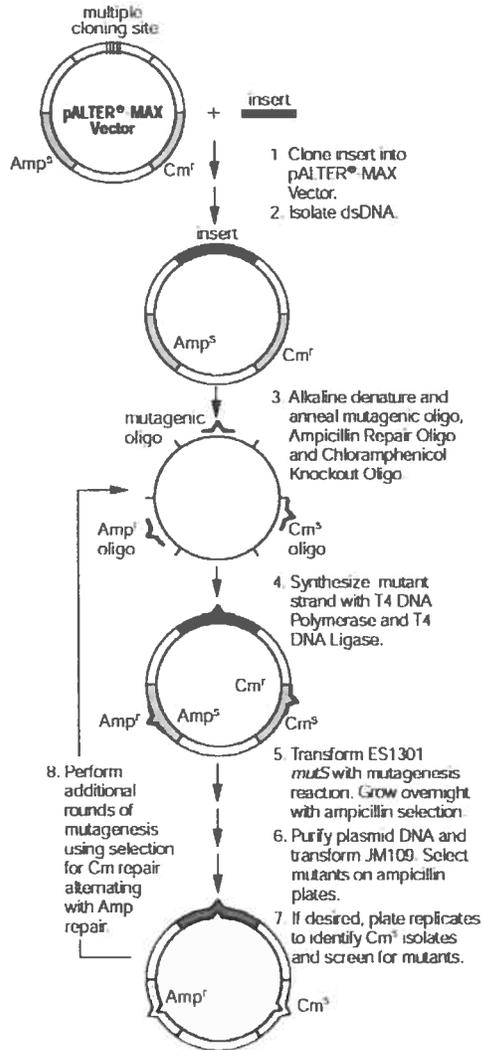
**Figure 6. Stratégie de mutagenèse « Altered Sites® II Mammalian Mutagenesis System » de Promega.**

**A)** Schéma du vecteur pALTER<sup>®</sup>-MAX utilisé dans cette trousse de mutagenèse. Ce plasmide contient les gènes de résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol (Cm<sup>r</sup>), mais la résistance à l'ampicilline a été inactivée (Amp<sup>s</sup>). **B)** Principales étapes de la stratégie de mutagenèse. L'insert GFP-Tau4R a été cloné dans pALTER<sup>®</sup>-MAX. Après une dénaturation alcaline de l'ADN plasmidique, les oligonucléotides de réparation de la résistance à l'ampicilline (Amp<sup>r</sup> oligo) et d'inactivation de celle au chloramphénicol (Cm<sup>s</sup> oligo), de même que l'amorce mutagénique, se lient au même brin d'ADN. La synthèse et la ligation du brin mutant ont ensuite lieu. Des bactéries compétentes *E. coli* ES1301 *mutS* sont alors transformées avec le mélange réactionnel de mutagenèse, car cette souche permet de diminuer les chances de réparer les erreurs d'appariement de l'ADN causées par les mutations insérées. Un transfert subséquent dans la souche JM109 permet une meilleure ségrégation des plasmides mutants et sauvages. Par suite de la sélection des mutants, il est possible d'insérer une seconde mutation à la protéine déjà mutée en faisant un nouveau cycle de mutagenèse, qui utilisera cette fois les oligos de réparation de la résistance au chloramphénicol et d'inactivation de celle à l'ampicilline. Le procédé peut ainsi être répété en alternant ces deux résistances aux antibiotiques.

A)



B)



Tirés du manuel technique no 041 de Promega « Altered Sites<sup>®</sup> II Mammalian Mutagenesis System »

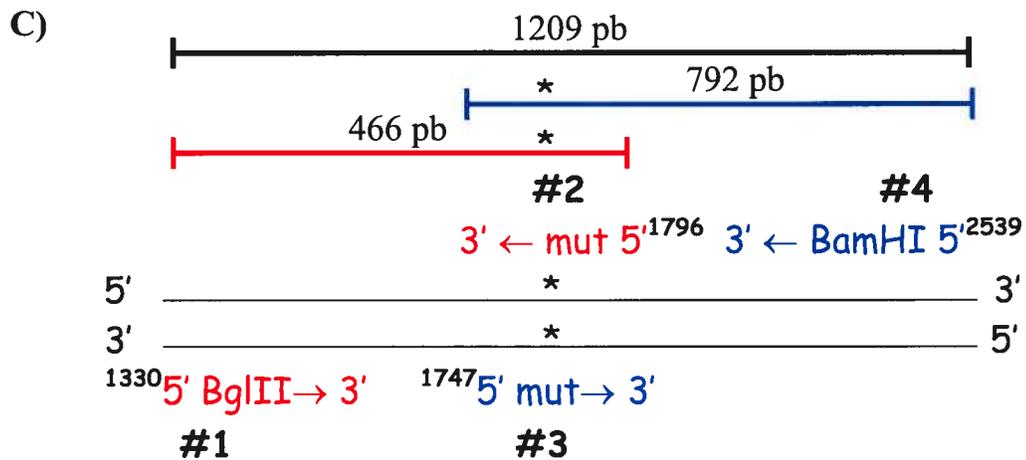
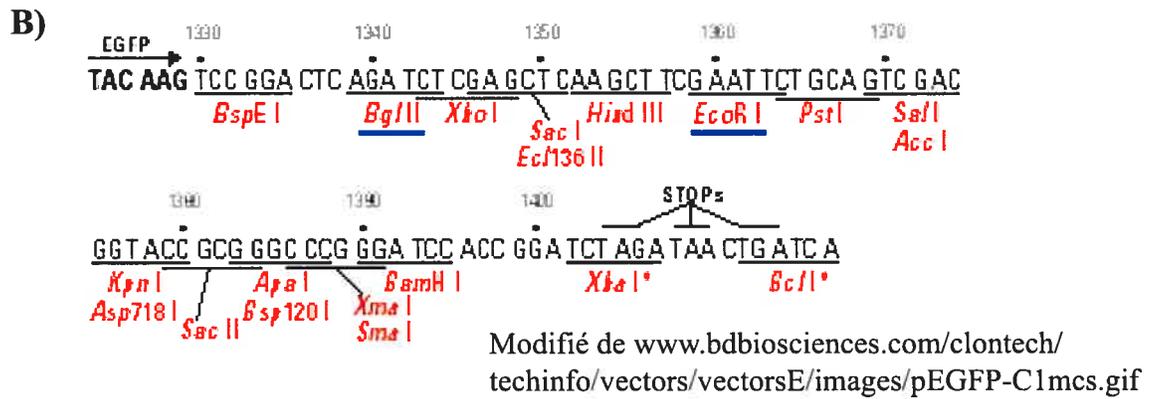
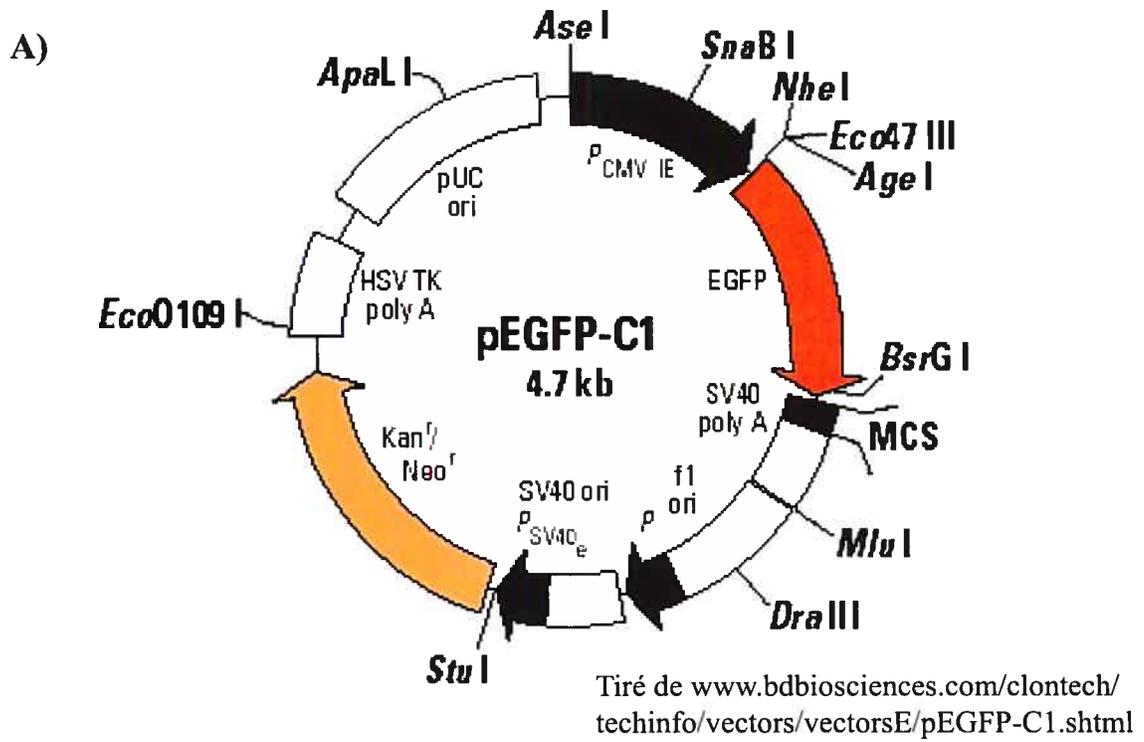


*BamH I* (Figures 7B et D, p. 50 et 51). La stratégie consistait donc en un système à deux paires d'amorces (Figures 7C et E) : la première paire était composée d'une amorce contenant le site de restriction enzymatique *Bgl II* (Amorce #1) et d'une autre possédant les mutations de tau à introduire (Amorce #2), alors que la deuxième paire comprenait également une amorce avec les mêmes mutations (Amorce #3) et une autre possédant le site *BamH I* (Amorce #4). Les amorces #2 et #3 étaient donc complémentaires (presque 100%), tandis que celles comprenant les sites *Bgl II* et *BamH I* étaient situées de part et d'autre de l'insert Tau4R. Par cette méthode, deux segments d'ADN (double brin) de tau devaient être amplifiés par PCR, un de 466 et un de 792 paires de bases (pb), contenant respectivement les sites enzymatiques *Bgl II* et *BamH I* en plus de contenir les mutations de tau (Figures 7C et F). Ces deux segments devaient ensuite être récupérés sur un gel d'agarose de type « low melt », puis être mélangés à part égale dans une seconde réaction PCR comprenant cette fois seulement les amorces #1 et #4 contenant les sites enzymatiques. En principe, les deux segments d'ADN contiendraient une portion complémentaire de 50 pb renfermant les mutations et devraient s'apparier ensemble en même temps que les amorces, après l'étape de dénaturation. Ainsi, un appariement se ferait entre les brins 2 et 3, sur lesquels se lieraient les amorces #1 et #4 respectivement (Figure 7F). La synthèse d'ADN (5' vers 3') se ferait alors grâce à l'action de la Taq polymérase, qui lierait également ensemble les bouts de l'ADN synthétisé avec ceux des brins 2 et 3. D'autre part, les brins 1 et 4 appariés au niveau de leur portion complémentaire pourraient eux-mêmes servir d'amorces et de matrices pour la synthèse par la polymérase. Ce second PCR amplifierait donc un segment d'ADN de 1209 pb correspondant à Tau4R, mais contenant les mutations et les sites *Bgl II* et *BamH I*. Cet ADN mutant de tau pourrait ensuite être sous-cloné dans le vecteur original grâce à ses sites uniques de restriction enzymatique, substituant ainsi l'ADN normal de tau.

Cette stratégie n'a cependant pas fonctionné elle non plus, mais cette fois à cause des amorces contenant les mutations (Amorces #2 et #3). Celles-ci renfermaient trois acides aminés à muter en glutamate ou en alanine (Figure 7E, p. 51). Ces amorces pouvaient donc difficilement s'apparier en raison de leur grande taille et des neuf bases azotées mutées qu'elles contenaient. Il importait donc de refaire des amorces ne comportant qu'un seul acide aminé à muter et de recommencer la procédure en introduisant une seule mutation à la fois dans la protéine tau.

**Figure 7. Stratégie de mutagenèse impliquant des étapes de PCR et de sous-clonage.**

**A)** Schéma du plasmide pEGFP-C1 de Clontech dans lequel l'insert Tau4R a été cloné. **B)** Séquence d'ADN du site de clonage multiple (MCS) de pEGFP-C1. Sont soulignés en bleu les deux sites de restriction enzymatique utilisés pour insérer Tau4R dans le plasmide, soient *Bgl* II et *Eco*R I. **C)** Schéma de la première partie de la stratégie à deux paires d'amorces pour générer les mutants par PCR. Les amorces #1 et #2 (en rouge) forment une première paire et amplifieraient un segment d'ADN de 466 pb. L'amorce #1 contient le site *Bgl* II et s'apparierait au brin anti-sens (3' → 5') du plasmide, alors que l'amorce #2 contient les mutations désirées et s'apparierait au brin sens (5' → 3'). L'amorce #3 (en bleu) est complémentaire à l'amorce #2 et s'apparierait donc au brin anti-sens. L'amorce #4 (en bleu), qui contient le site *Bam*H I et qui se lierait au brin sens du plasmide, forme la seconde paire avec l'amorce #3, lesquelles amplifieraient un fragment de 792 pb. Les astérisques représentent les mutations de tau. Un troisième fragment (en noir), correspondant à Tau4R en entier, pourrait également être produit par les amorces #1 et #4, mais ce dernier ne nous intéresserait pas pour le moment car il ne contiendrait pas les mutations désirées. **D)** Partie de la séquence d'ADN du plasmide pEGFP-C1 contenant l'insert Tau4R. Y sont représentés, de 5' vers 3', une partie du MCS (en noir) jusqu'au site *Bgl* II (souligné en noir), le début de Tau4R (en bleu), puis une section renfermant 3 acides aminés à muter en glutamate et en alanine, soit les sérines 199 et 202 et la thréonine 205 (soulignés en bleu), suivie d'une autre section du MCS contenant le site *Bam*H I (en noir). **E)** Séquences des 4 amorces utilisées au cours de cette stratégie. Les sites de restriction enzymatique employés y sont soulignés, de même que les 3 acides aminés mutés en glutamate. **F)** Schéma de la deuxième partie de la stratégie. Lors du second PCR, qui n'utiliserait que les amorces #1 et #4, les brins 2 (466 pb en rouge) et 3 (792 pb en bleu) générés par le premier PCR s'apparieraient au niveau de leur portion complémentaire de 50 pb contenant les mutations (astérisques) et seraient liés par les amorces #1 et #4 respectivement. La synthèse d'ADN se ferait donc de 5' en 3' grâce à la polymérase, qui lierait également ensemble l'ADN synthétisé avec les brins 2 et 3. Les brins 1 et 4, également appariés, serviraient eux-mêmes d'amorces et de matrices pour la synthèse par la polymérase. Un segment d'ADN de 1209 pb correspondant à Tau4R, mais contenant les mutations de tau et les sites *Bgl* II et *Bam*H I, serait donc amplifié. Il pourrait ensuite être sous-cloné dans le vecteur original grâce à ses sites enzymatiques.





### 3.1.3. Stratégie «QuikChange® XL site-directed mutagenesis kit » de Stratagene

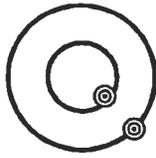
Comme la deuxième stratégie tentée était plutôt laborieuse et qu'elle devait être recommencée avec de nouvelles amorces, nous avons cherché une autre technique qui serait plus rapide. Nous avons alors découvert celle de Stratagene, qui n'implique aucune étape de sous-clonage (Figure 8, p. 54). Contrairement à la précédente, cette méthode n'utilise qu'une seule paire d'amorces complémentaires contenant la mutation désirée. Grâce à des cycles de températures, le plasmide pEGFP-C1 contenant l'insert Tau4R est dénaturé par la chaleur et les amorces vont s'apparier au même endroit sur le plasmide mais sur un brin différent. Les deux brins du plasmide sont ensuite répliqués au complet grâce à l'action hautement fidèle de l'ADN polymérase *Pfu Turbo* et à un temps d'élongation suffisamment long, générant ainsi deux brins circulaires mutés mais ouverts. Cette méthode utilise donc les mêmes cycles de températures qu'un PCR standard. Cependant, il s'agit d'une méthode à amplification dite linéaire plutôt qu'exponentielle, puisque les amorces sont construites de manière à amplifier seulement les brins parentaux du vecteur et non les brins nouvellement synthétisés (brins filles). En effet, comme les amorces sont complémentaires, plutôt que d'être situées de part et d'autre d'un fragment à amplifier, la seule liaison possible avec les brins filles a lieu au niveau de l'amorce complémentaire incorporée dans les brins filles. De ce fait, l'élongation ne pourra se faire en raison de l'ouverture présente dans ceux-ci. Autrement dit, la polymérase sera incapable d'incorporer un nucléotide à la suite de l'amorce, car il n'y aura pas de brin matrice pour lui indiquer lequel insérer. Les brins filles ne peuvent donc pas être amplifiés par cette stratégie et seuls les brins parentaux le sont, d'où l'appellation « amplification linéaire ».

Après les cycles de températures, le produit était traité avec l'endonucléase *Dpn I*, qui clive l'ADN seulement lorsque sa séquence cible est méthylée (5'...G<sup>m</sup>ATC...3'). Comme l'ADN isolé de presque toutes les souches de *E. coli* est *dam* méthylé, c'est-à-dire méthylé à ce site, seul l'ADN parental sera digéré par l'enzyme puisqu'il a été isolé à partir de bactéries DH5 $\alpha$ . Il ne restera alors que les plasmides mutés ouverts. Ceux-ci étaient ensuite transformés dans des bactéries compétentes DH5 $\alpha$  (au lieu des « XL10-Gold »), qui vont réparer les ouvertures qu'ils contiennent et donc les refermer.

**Figure 8. Principe de la stratégie de mutagenèse «QuikChange® XL site-directed mutagenesis kit » de Stratagene, utilisée pour générer tous les mutants de tau.**

Le plasmide pEGFP-C1 renfermant l'insert Tau4R est dénaturé par une augmentation de la température et les amorces complémentaires contenant la mutation désirée vont s'apparier chacune à un des deux brins d'ADN du plasmide. L'ADN polymérase *Pfu Turbo* permet ensuite la réplication des brins du vecteur avec une grande fidélité, en leur incorporant les amorces mutagéniques, ce qui génère deux brins circulaires ouverts. Après les cycles de températures, l'ADN parental méthylé et non muté est digéré avec l'enzyme de restriction *Dpn I*. Il ne reste alors que les plasmides (double brin) mutés ouverts, puisque n'étant pas méthylés, ils ne peuvent être digérés. Ceux-ci sont ensuite transformés dans des bactéries compétentes (*DH5α* dans notre cas), qui vont permettre la ligation des brins et donc refermer les plasmides mutants.

Step 1  
Plasmid Preparation



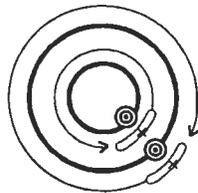
Gene in plasmid with target site (⊗) for mutation

Step 2  
Temperature Cycling



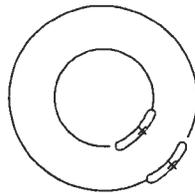
Mutagenic primers

Denature the plasmid and anneal the oligonucleotide primers (X) containing the desired mutation (X)



Using the nonstrand-displacing action of *PfuTurbo* DNA polymerase, extend and incorporate the mutagenic primers resulting in nicked circular strands

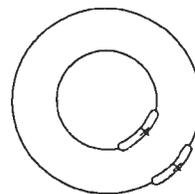
Step 3  
Digestion



Mutated plasmid (contains nicked circular strands)

Digest the methylated, nonmutated parental DNA template with *Dpn* I

Step 4  
Transformation



Transform the circular, nicked dsDNA into XL10-Gold ultracompetent cells

After transformation, the XL10-Gold ultracompetent cells repair the nicks in the mutated plasmid

LEGEND

-  Parental DNA plasmid
-  Mutagenic primer
-  Mutated DNA plasmid

Tiré du manuel d'instructions de Stratagene « QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit », [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com)

Comme les amorces mutagéniques générées précédemment étaient problématiques (Figure 7E, p. 51, Amorces #2 et #3), de nouvelles amorces ne comportant cette fois qu'un seul acide aminé muté, en glutamate et en alanine, ont été produites. Ces amorces n'introduisaient donc qu'une seule mutation à la fois dans la protéine tau et la procédure a dû être répétée pour chaque mutation subséquente que nous souhaitions y introduire. La figure 9 (p. 57) illustre ce principe avec les amorces utilisées pour muter les acides aminés Ser<sup>199</sup> et Ser<sup>202</sup> en glutamate (GAA). Ainsi, après à la transformation bactérienne, plusieurs colonies étaient sélectionnées sur une gélose contenant l'antibiotique approprié, ici la kanamycine vu la résistance du vecteur pEGFP-C1 (voir Figure 7A, p. 50). L'ADN plasmidique de celles-ci était ensuite purifié et séquencé afin d'identifier les clones ayant incorporé la mutation désirée, soit la sérine 199 mutée en glutamate dans le présent exemple (Figure 9C, p. 57). Par le fait même, la séquence de tau était vérifiée en entier pour s'assurer qu'aucune autre mutation indésirable n'avait été introduite dans la protéine. Une fois le clone mutant identifié, ici le 199Glu, la procédure de mutagenèse était répétée avec cet ADN afin d'y introduire une seconde mutation, soit la sérine 202 mutée en glutamate. Pour ce faire, les amorces devaient contenir l'acide aminé 199 déjà muté en glutamate et celui à muter, ici le 202 (Figure 9D, p. 57). Il importait alors d'incorporer ces mutations dans cet ordre car l'inverse n'aurait pas fonctionné avec ces amorces.

Cette procédure de Stratagene s'est avérée très efficace. Elle a donc été répétée pour chaque nouvelle mutation à insérer dans la protéine tau. De cette façon, un premier mutant de tau contenant trois sites mutés a d'abord été produit : les acides aminés Ser<sup>214</sup>, Thr<sup>212</sup> et Ser<sup>422</sup> ont été mutés dans cet ordre en alanine et en glutamate (Figure 10A, p. 59). En parallèle, les acides aminés Ser<sup>199</sup>, Ser<sup>202</sup>, Thr<sup>205</sup>, Ser<sup>396</sup> et Ser<sup>404</sup> ont été mutés, générant un second mutant à cinq sites mutés (Figure 10B, p. 59). Finalement, à ces cinq mutations ont été ajoutées celles des sites Ser<sup>214</sup>, Thr<sup>231</sup>, Ser<sup>235</sup>, Ser<sup>262</sup>, Ser<sup>356</sup>, Ser<sup>400</sup> et Ser<sup>409</sup>, produisant ainsi le plus gros des mutants avec douze sites mutés en alanine et en glutamate (Figure 10C, p. 59). Cependant, comme les mutations ont été introduites les unes après les autres et que chaque site a été muté en alanine et en glutamate, trente mutants ont été générés au total. Ainsi, des mutants contenant un nombre croissant de sites mutés ont été produits.



**Figure 9. Aperçu du procédé employé pour incorporer une à la fois les mutations à la protéine tau avec la méthode de Stratagene.**

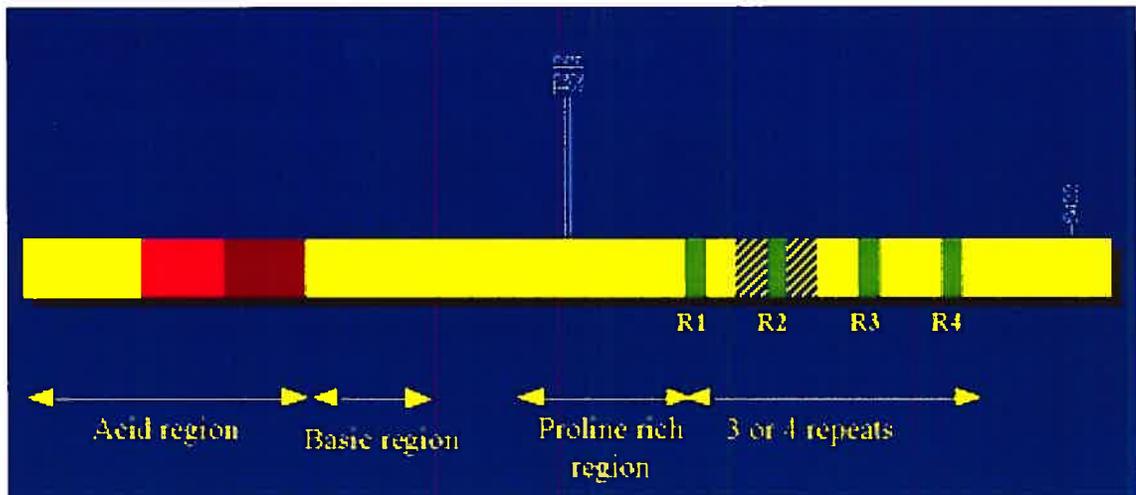
A) Partie de la séquence normale de l'ADN de tau. Trois des acides aminés à muter y sont soulignés et identifiés par le numéro de leur position sur la protéine. B) Paire d'amorces complémentaires utilisées pour introduire la première mutation à la protéine tau, c'est-à-dire pour muter l'acide aminé Ser<sup>199</sup> en glutamate. Ces amorces contiennent donc la séquence du glutamate (en gras), GAA (ou TTC pour l'amorce anti-sens), à la position de la Ser<sup>199</sup>. C) Partie de la séquence d'ADN de tau d'un plasmide ayant incorporé la mutation 199Glu. Suite au séquençage des divers clones vérifiés, la séquence GAA (en gras) est observée chez les mutants au lieu du AGC normalement retrouvé à la position 199. D) Paire d'amorces utilisée pour générer la deuxième mutation de tau, soit la substitution de la sérine 202 par le glutamate. Comme cette seconde mutation est ajoutée à la protéine tau contenant déjà la mutation 199Glu, les amorces comprennent donc l'acide aminé glutamate de la position 199 déjà mutée (souligné) et un autre pour muter la sérine 202 (souligné et en gras). Il suffit donc de reprendre la procédure de mutagenèse de Stratagene avec ces nouvelles amorces et l'ADN mutant 199Glu pour générer le mutant 199-202Glu.



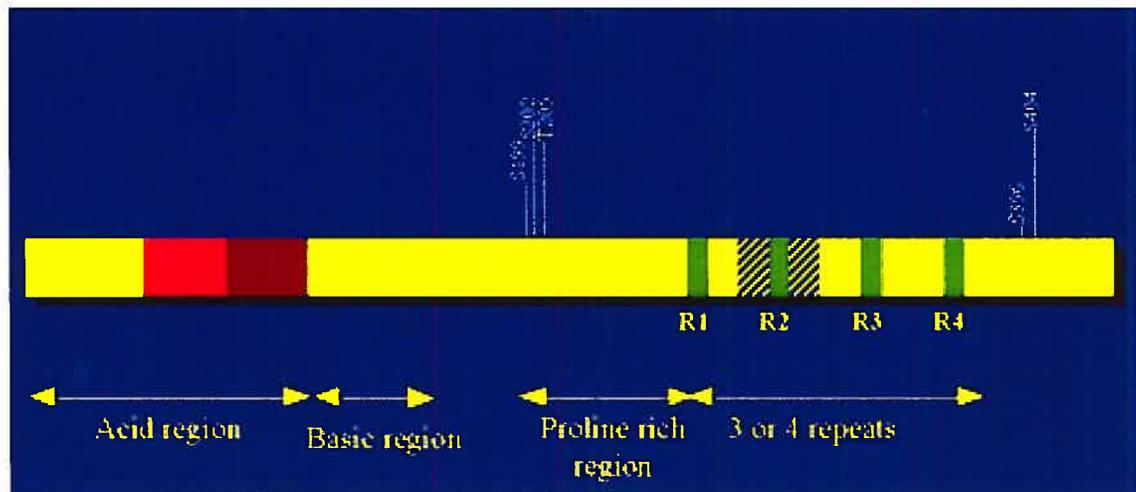
**Figure 10. Différents mutants de tau produits.**

**A)** Schéma du mutant de tau à 3 sites mutés. La position des sérines (S) 214, 422 et de la thréonine (T) 212 mutées est représentée sur le gène de la plus longue isoforme humaine de tau, soit celle de 441 acides aminés. **B)** Schéma du mutant de tau à 5 sites mutés. Les sérines 199, 202, 396, 404 et la thréonine 205 ont été mutées. **C)** Schéma du plus gros des mutants de tau produits, celui à 12 sites mutés. Ce mutant contient les 5 mêmes sites mutés que celui montré en B), mais il comprend également les sérines 214, 235, 262, 356, 400, 409 et la thréonine 231 mutées. Dans tous les cas, tous ces sites ont été mutés en alanine d'une part, et en glutamate d'autre part, générant ainsi 2 mutants pour chaque site.

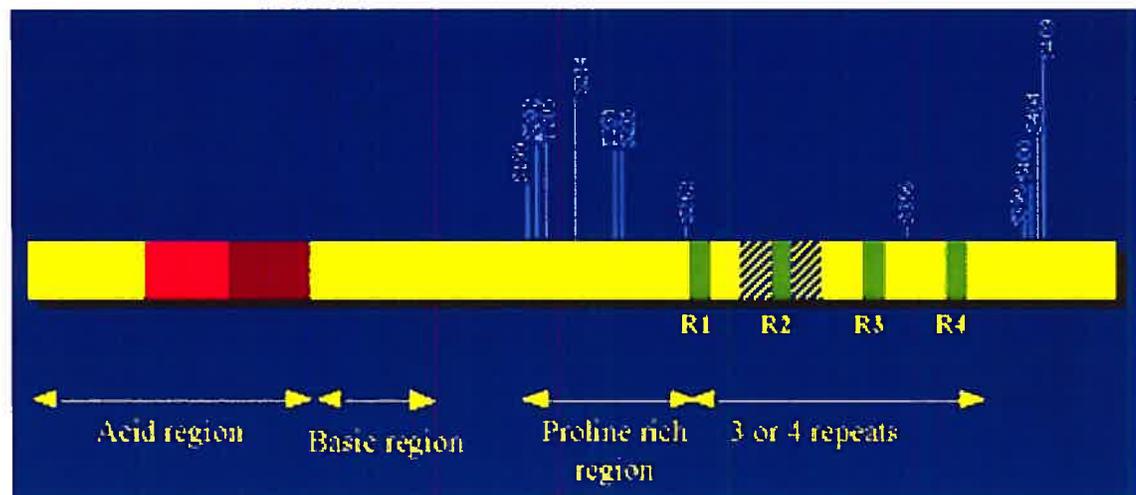
A)



B)



C)



Le fait que les mutations aient été introduites les unes après les autres offrait la possibilité de vérifier les effets engendrés par chacune d'entre elles. En d'autres mots, ceci pourrait donner des indications quant à l'importance de la phosphorylation à un site particulier et permettrait de voir à partir de quel moment la phosphorylation exerce un effet sur la localisation de tau dans les neurones.

#### **3.1.4. Expression des mutants dans les cellules HeLa**

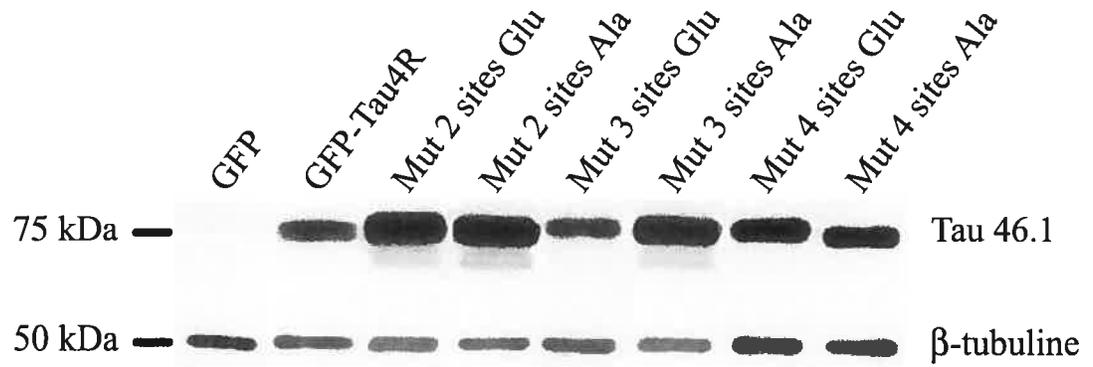
D'abord, l'expression des formes mutantes de tau dans les cellules HeLa, qui n'expriment pas cette protéine normalement, a été vérifiée par immunobuvardage (Figure 11, p. 62). L'anticorps 46.1, qui reconnaît la protéine tau indépendamment de son état de phosphorylation, a été utilisé pour visualiser autant les mutants glutamate, qui miment la phosphorylation, que les mutants alanine, qui représentent la forme non phosphorylable. L'épitope reconnu par cet anticorps a été identifié par Kosik *et al.* (1988) comme étant la région de tau comprise entre les acides aminés Ser<sup>404</sup> et Leu<sup>441</sup>, soit l'extrémité C-terminale de la protéine. Carmel *et al.* (1996) ont démontré par la suite que la portion de cet épitope nécessaire à la liaison de l'anticorps correspond en fait aux acides aminés Leu<sup>428</sup> à Leu<sup>441</sup>. La figure 11 (p. 62) témoigne de la spécificité de l'anticorps pour tau vu l'absence de bande lorsque la GFP seule était exprimée dans les cellules. La bande représentant la protéine Tau4R de 383 acides aminés fusionnée à la GFP correspond à un poids moléculaire d'environ 75 kDa.

Les résultats démontrent que l'expression de la protéine tau n'a pas été affectée par les mutations qui lui avaient été introduites. Cependant, de légères variations du poids moléculaire ont été observées proportionnellement au nombre croissant de sites mutés contenus dans la protéine. Les protéines dont plusieurs acides aminés avaient été mutés en glutamate se retrouvaient à un poids moléculaire un peu plus élevé que celui de la protéine tau normale, alors que celles contenant des sites mutés en alanine possédaient un plus faible poids. Ce phénomène était déjà observable à partir de quatre sites mutés (Figure 11A, p. 62), mais il était nettement plus prononcé chez les protéines renfermant douze sites mutés (Figure 11B, p. 62).

**Figure 11. Visualisation de l'expression des protéines tau mutantes dans les cellules HeLa.**

**A)** Expression des mutants de tau contenant deux à quatre sites mutés. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides pEGFP-C1 sans insert (GFP) et avec l'insert Tau4R (GFP-Tau4R), de même qu'avec les mutants de tau contenant les acides aminés Thr<sup>212</sup> et Ser<sup>214</sup> mutés en glutamate (Mut 2 sites Glu) et en alanine (Mut 2 sites Ala), les mutants 199-202-205Glu et Ala (Mut 3 sites Glu et Ala), et les mutants 199-202-205-396Glu et Ala (Mut 4 sites Glu et Ala). La protéine tau a été visualisée grâce à l'anticorps phospho-indépendant 46.1. L'isoforme de Tau4R à 383 acides aminés fusionnée à la GFP possède un poids moléculaire d'environ 75 kDa sur un gel de polyacrylamide 7,5%. Les membranes de nitrocellulose ont aussi été révélées avec l'anticorps monoclonal anti- $\beta$ -tubuline. **B)** Expression des mutants de tau contenant douze sites mutés. Les douze acides aminés mutés en glutamate et en alanine sont les suivants : Ser<sup>199</sup>, Ser<sup>202</sup>, Thr<sup>205</sup>, Ser<sup>214</sup>, Thr<sup>231</sup>, Ser<sup>235</sup>, Ser<sup>262</sup>, Ser<sup>356</sup>, Ser<sup>396</sup>, Ser<sup>400</sup>, Ser<sup>404</sup> et Ser<sup>409</sup>. Ces mutations ont également été insérées dans GFP-Tau4R.

A)



B)



## 3.2. DISTRIBUTION DE LA PROTÉINE TAU ENDOGÈNE

### 3.2.1. Enrichissement de tau endogène dans l'axone

Avant d'étudier les effets des mutants, il importait d'abord de connaître la distribution de la protéine tau endogène des neurones de l'hippocampe en culture dans du milieu contenant le supplément B27 (Brewer *et al.*, 1993). Peu de données sont disponibles à ce sujet, car la majorité des études sur tau utilisant des cultures de neurones ont été réalisées avec du milieu contenant un autre type de supplément, le N2 (Bottenstein and Sato, 1979). Les neurones ont donc été marqués avec l'anticorps PolyTau à différents moments de leur développement (Figure 12, p. 65). Cet anticorps reconnaît toutes les isoformes de tau indépendamment de leur état de phosphorylation. Ainsi, au premier jour en culture, la protéine tau était distribuée dans tous les compartiments du neurone et apparaissait parfois plus abondante dans l'extrémité distale de l'axone. C'est ce qu'on appelle le gradient proximo-distal de tau (Kempf *et al.*, 1996). Ensuite, plus les neurones atteignaient des stades avancés de leur développement et plus le marquage de tau disparaissait du corps cellulaire et des dendrites. Au jour 7 et plus tard (les neurones ont été marqués jusqu'au jour 14), la protéine était principalement concentrée dans l'axone, mais un très faible marquage au niveau du corps cellulaire et parfois des dendrites restait observable. Les neurones ont également été marqués avec un anticorps contre MAP2, qui est somato-dendritique, afin de bien distinguer les divers compartiments cellulaires. À noter que MAP2 se retrouve également dans l'axone chez les neurones âgés d'un jour (Caceres *et al.*, 1986), bien qu'il soit alors difficile à distinguer en raison de sa faible intensité et du fait que les neurones ont été incubés avec l'anticorps pendant une courte période (une heure seulement).

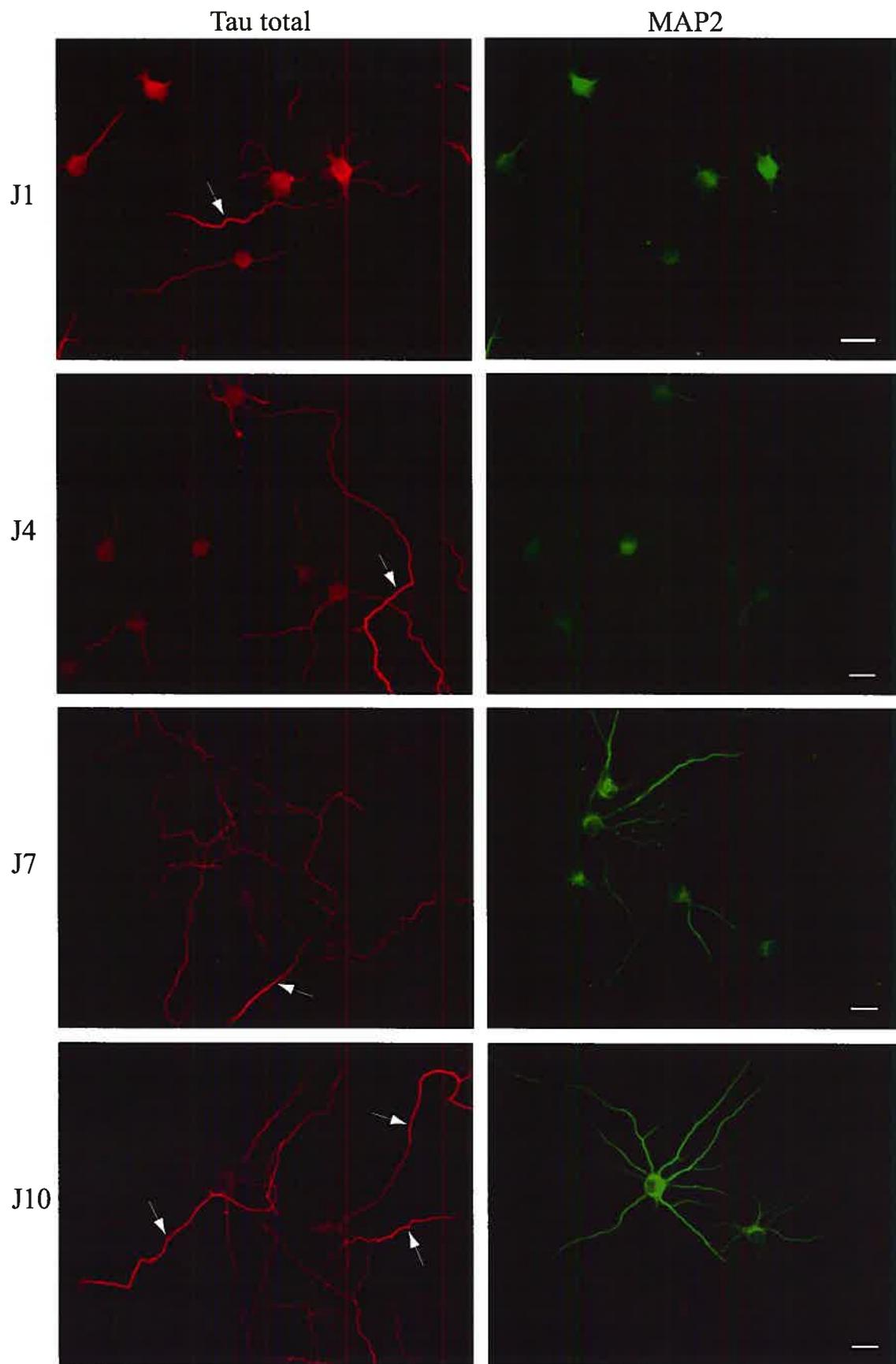
### 3.2.2. Enrichissement de tau déphosphorylée dans l'axone

Par suite des observations précédentes et compte tenu de l'objectif de cette étude, l'état de phosphorylation de tau endogène a été vérifié. Pour ce faire, les neurones ont été marqués avec des anticorps dépendants de la phosphorylation. D'abord, l'anticorps déphospho-dépendant Tau-1 a été utilisé (Figure 13, p. 68). Selon Kosik *et al.* (1988), cet anticorps reconnaît un épitope déphosphorylé de tau autour des acides aminés 189-207,



**Figure 12. Distribution de la protéine tau endogène totale dans les neurones de l'hippocampe de rat au cours de leur développement en culture.**

L'anticorps PolyTau (en rouge) a été utilisé pour visualiser toutes les isoformes de tau (tau totale) présentes dans les neurones, indépendamment de leur état de phosphorylation. Pour distinguer les différents compartiments cellulaires, les neurones ont aussi été marqués avec l'anticorps AP20 (en vert) dirigé contre la protéine MAP2, qui se retrouve dans le corps cellulaire et les dendrites. Les neurones ont été marqués aux jours (J) 1, 4, 7 et 10 de leur développement. À partir du jour 7, tau devient enrichie dans l'axone et un gradient proximo-distal de la protéine est observé dans la majorité des axones. Ce gradient est également visible dans certains axones de neurones au jour 1. Les flèches désignent des axones qui montrent un gradient proximo-distal de tau. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .



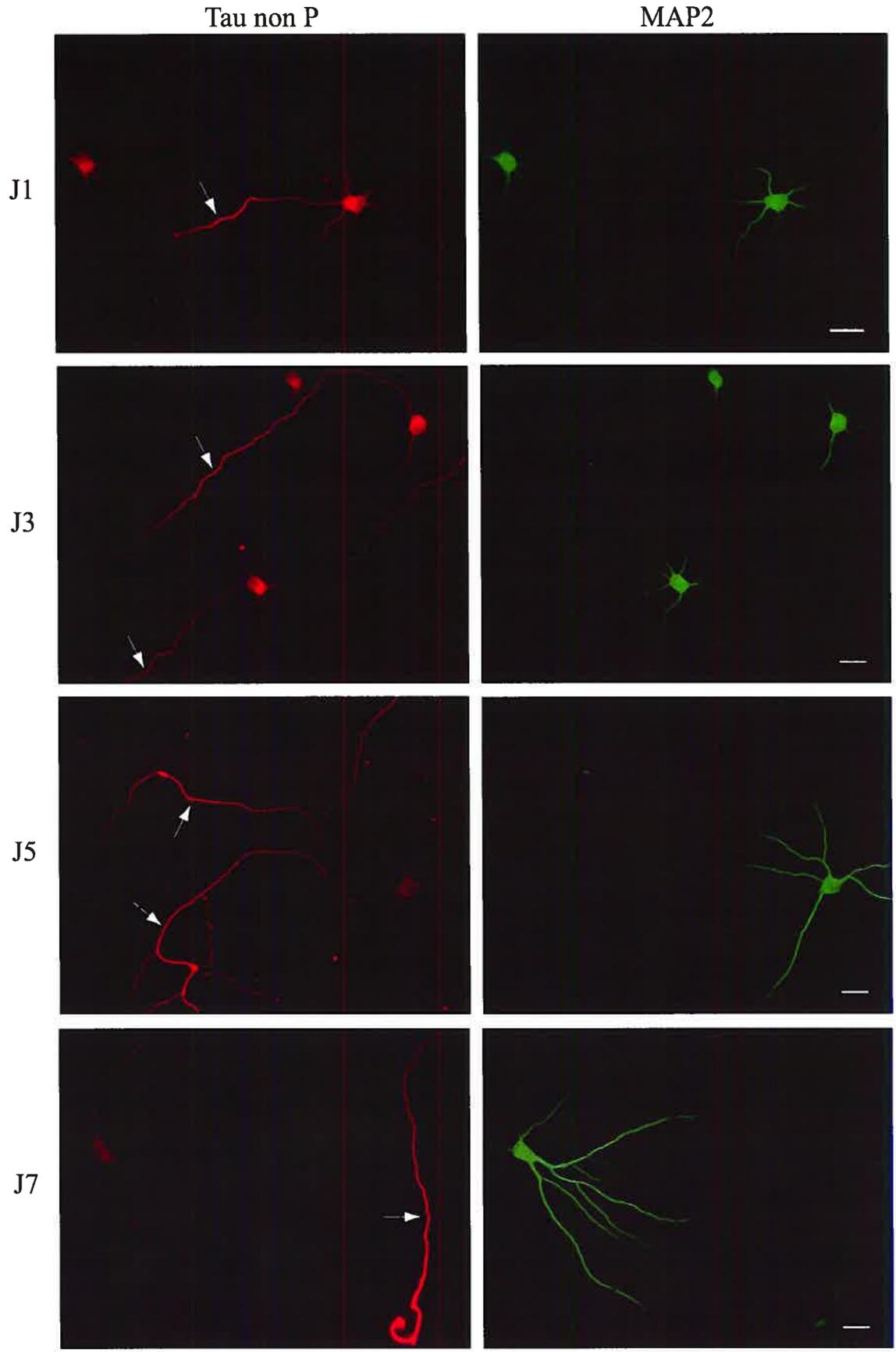
que Szendrei *et al.* (1993) ont par la suite précisé comme étant les acides aminés 192-204. Parmi cette séquence, on retrouve les sérines 195, 198, 199 et 202, qui doivent être déphosphorylées pour permettre une liaison de haute affinité avec l'anticorps Tau-1 (Szendrei *et al.*, 1993). Afin de définir avec plus de précision la distribution de tau au cours du développement des neurones en culture, ces derniers ont été marqués cette fois à des intervalles de temps plus courts, soit aux deux jours et ce du jour 1 au jour 14. Ainsi, la présence de tau déphosphorylée a été détectée dans tous les compartiments des neurones aux jours 1 à 3 et un gradient proximo-distal était présent dans plusieurs axones (Figure 13, p. 68). Cependant, à partir du jour 5, tau déphosphorylée se retrouvait principalement dans les extrémités distales des axones. À remarquer que même dans un axone très ramifié, ce gradient était présent dans l'extrémité de toutes les ramifications (J5). Le patron de marquage était donc très similaire à celui qui avait été observé avec l'anticorps PolyTau (Figure 12, p. 65). Le marquage de MAP2 avec l'anticorps PolyMAP2 était cependant plus intense au jour 1 que celui qui avait été obtenu avec AP20 (Figure 12, p. 65), puisqu'il a été effectué au cours d'une nuit complète au lieu d'une heure d'incubation. On a alors pu constater la présence de MAP2 dans l'axone en plus du corps cellulaire et des dendrites.

### 3.2.3. Distribution de tau phosphorylée dans tous les compartiments cellulaires

Les neurones ont également été marqués avec l'anticorps phospho-dépendant AT8 (Figure 14, p.70), dont l'épitope est situé entre les résidus 195 et 213 de la protéine tau (Goedert *et al.*, 1995). Cet anticorps reconnaît tau seulement si les acide aminés Ser<sup>202</sup> et Thr<sup>205</sup> sont phosphorylés simultanément (Biernat *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1993, 1995; Szendrei *et al.*, 1993). Ainsi, les neurones d'un jour contenaient des protéines tau phosphorylées dans tous leurs compartiments cellulaires, quoique le marquage au niveau du corps cellulaire était légèrement plus prononcé. Cependant, très peu de neurones ont montré un gradient proximo-distal dans leur axone. Les gradients sont surtout apparus à partir du jour 3 et sont devenus plus intenses à partir du jour 5, sans que le marquage au niveau du corps cellulaire et des dendrites ne diminue pour autant. De plus, ce patron de marquage est demeuré inchangé au-delà du jour 5. La protéine tau phosphorylée à l'épitope reconnu par AT8 se retrouve donc presque uniformément dans tous les compartiments cellulaires, peu importe le stade de développement des neurones. Des gradients proximo-distaux sont tout de même observés dans les axones, bien qu'ils soient

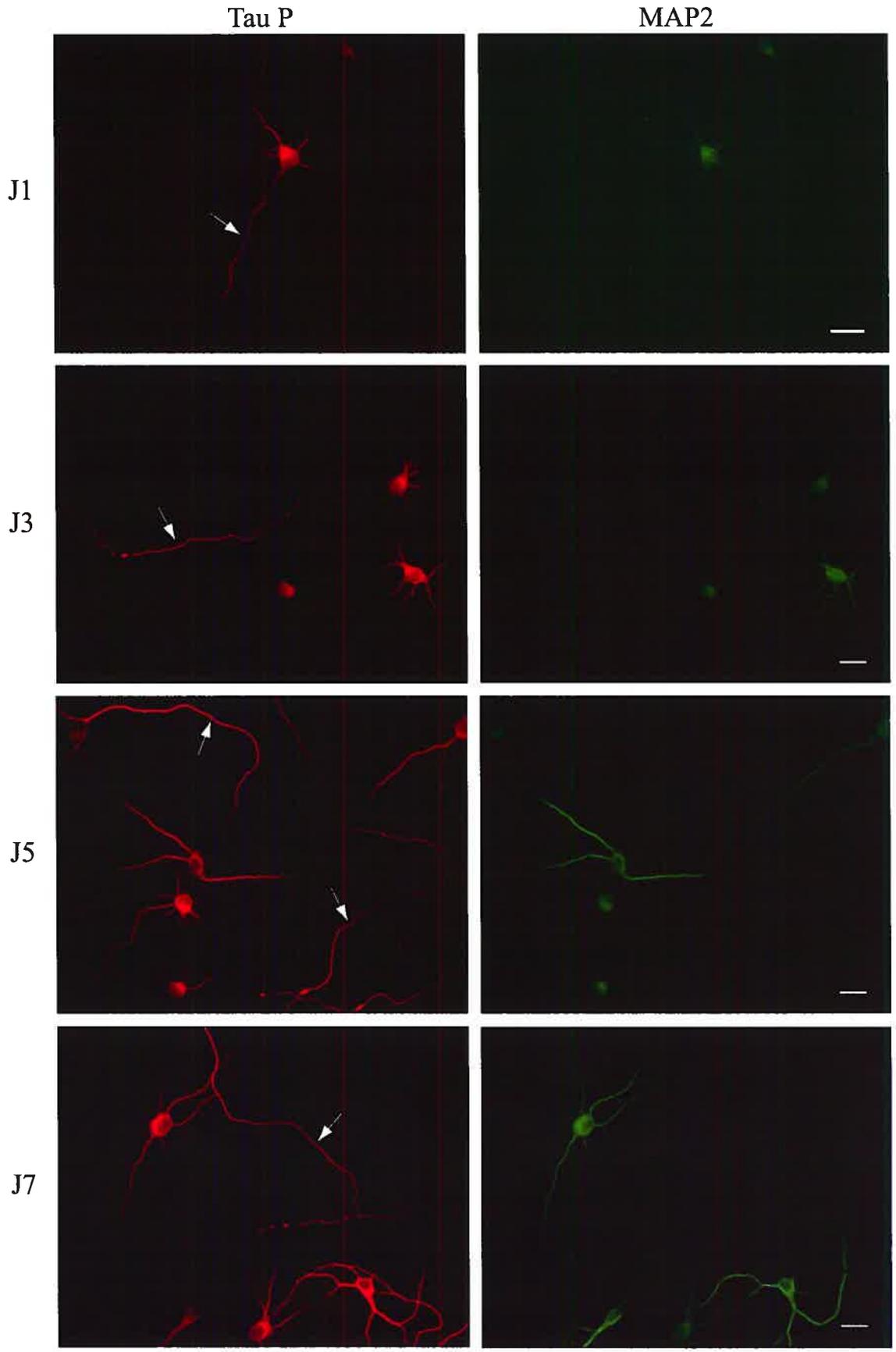
**Figure 13. Distribution de la protéine tau endogène déphosphorylée dans les neurones de l'hippocampe de rat au cours de leur développement en culture.**

Les neurones ont été doublement marqués avec l'anticorps Tau-1 (en rouge), qui reconnaît un épitope déphosphorylé de tau, et avec l'anticorps PolyMAP2 (en vert) dirigé contre la protéine MAP2. La figure montre les marquages aux jours (J) 1, 3, 5 et 7 du développement neuronal. La protéine tau déphosphorylée devient enrichie dans la partie distale des axones vers le jour 5 du développement. Les flèches désignent des axones avec un gradient proximo-distal de tau. Noter aussi la présence de MAP2 dans l'axone à jour 1. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 14. Distribution de la protéine tau endogène phosphorylée dans les neurones de l'hippocampe de rat au cours de leur développement en culture.**

Les neurones ont été doublement marqués avec l'anticorps AT8 (en rouge), qui reconnaît un épitope phosphorylé de tau, et avec l'anticorps PolyMAP2 (en vert) dirigé contre la protéine MAP2. La figure montre les marquages aux jours (J) 1, 3, 5 et 7 du développement neuronal. La protéine tau phosphorylée se retrouve dans tous les compartiments des neurones peu importe le stade de développement et des gradients proximo-distaux apparaissent dans certains axones vers le jour 3. Les flèches désignent des axones, dont certains présentent un gradient proximo-distal de tau. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .



parfois moins prononcés que ceux observés avec PolyTau et Tau-1 (Figures 12 et 13, p. 65 et 68). Le marquage avec l'anticorps PolyMAP2 était très pâle chez les neurones d'un jour pour les mêmes raisons que le marquage avec AP20 l'était (Figure 12, p. 65).

D'autres anticorps phospho-dépendants ont été utilisés pour marquer la protéine tau endogène (résultats non montrés). C'est le cas de l'anticorps PHF-1, qui détecte les PHFs de tau retrouvées dans la maladie d'Alzheimer (Greenberg *et al.*, 1992). Plus précisément, Lang *et al.* (1992) ont montré que l'épitope de cet anticorps correspond à la séquence d'acides aminés 389-402 de tau, dont les sites Ser<sup>396</sup> ou Ser<sup>400</sup> doivent être phosphorylés. Plus tard, il a été démontré par cette même équipe que PHF-1 reconnaît préférentiellement la protéine tau lorsqu'elle est phosphorylée aux acides aminés Ser<sup>396</sup> et Ser<sup>404</sup> simultanément (Otvos *et al.*, 1994). Le marquage obtenu avec cet anticorps indiquait que la protéine tau phosphorylée à ces sites se retrouvait dans le corps cellulaire, les dendrites et l'axone, lequel présentait parfois un gradient proximo-distal (résultats non montrés). Un marquage similaire à ceux observés avec AT8 et PHF-1 a aussi été obtenu avec l'anticorps CP13, dirigé contre l'épitope Ser<sup>202</sup> phosphorylé (Jicha *et al.*, 1999; Ishizawa *et al.*, 2003). La protéine tau endogène phosphorylée des neurones en culture semble donc distribuée de façon similaire avec les trois anticorps phospho-dépendants utilisés.

### 3.3. DISTRIBUTION DE LA PROTÉINE TAU EXOGÈNE

#### 3.3.1. Distribution uniforme de GFP-Tau4R dans tous les compartiments cellulaires

Avant d'exprimer les différents mutants de tau dans les neurones en culture, la distribution de la protéine tau exogène humaine normale (GFP-Tau4R) a été vérifiée (Figure 15, p. 74). Le moment choisi pour transfecter les neurones a été fixé au jour 7 du développement, car c'est à partir de ce moment qu'on peut observer un enrichissement de tau endogène dans l'axone (Figure 12, p. 65). Les neurones ont été fixés à différents temps après la transfection, faisant ainsi varier le temps d'expression de GFP-Tau4R de trois à vingt-quatre heures (Figure 15, p. 74). Toujours pour permettre de bien distinguer l'axone des autres compartiments cellulaires, les neurones transfectés ont été marqués avec l'anticorps PolyMAP2. Étonnamment, l'expression de la protéine tau exogène dans les neurones transfectés était déjà détectable après un temps d'expression aussi court que trois heures (3h). De plus, les résultats ont montré qu'elle se retrouvait au départ dans le corps



cellulaire et le début des prolongements (Figure 15, 3h, p. 74). À noter qu'on ne distingue pas l'axone du neurone montré à trois heures d'expression, ce qui n'était pas toujours le cas. Même si la fluorescence de la GFP n'apparaissait que sur une courte portion de la partie proximale des prolongements, on arrivait parfois à identifier l'axone.

À mesure que le temps d'expression augmentait, la protéine se répartissait de plus en plus loin dans les prolongements, bien qu'elle demeurait tout aussi présente au niveau du corps cellulaire (Figure 15, 6 et 9h, p. 74). À vingt-quatre heures d'expression, les prolongements contenaient GFP-Tau4R sur l'ensemble de leur longueur. De longs axones étaient visibles mais sans gradient proximo-distal. La protéine tau exogène commence donc par remplir le corps cellulaire puis les prolongements cytoplasmiques, les dendrites comme l'axone. Cette distribution n'est pas du tout représentative de celle observée dans le cas de la protéine tau endogène totale, telle que révélée avec l'anticorps PolyTau qui démontrait alors un enrichissement dans l'axone (Figure 12, p. 65).

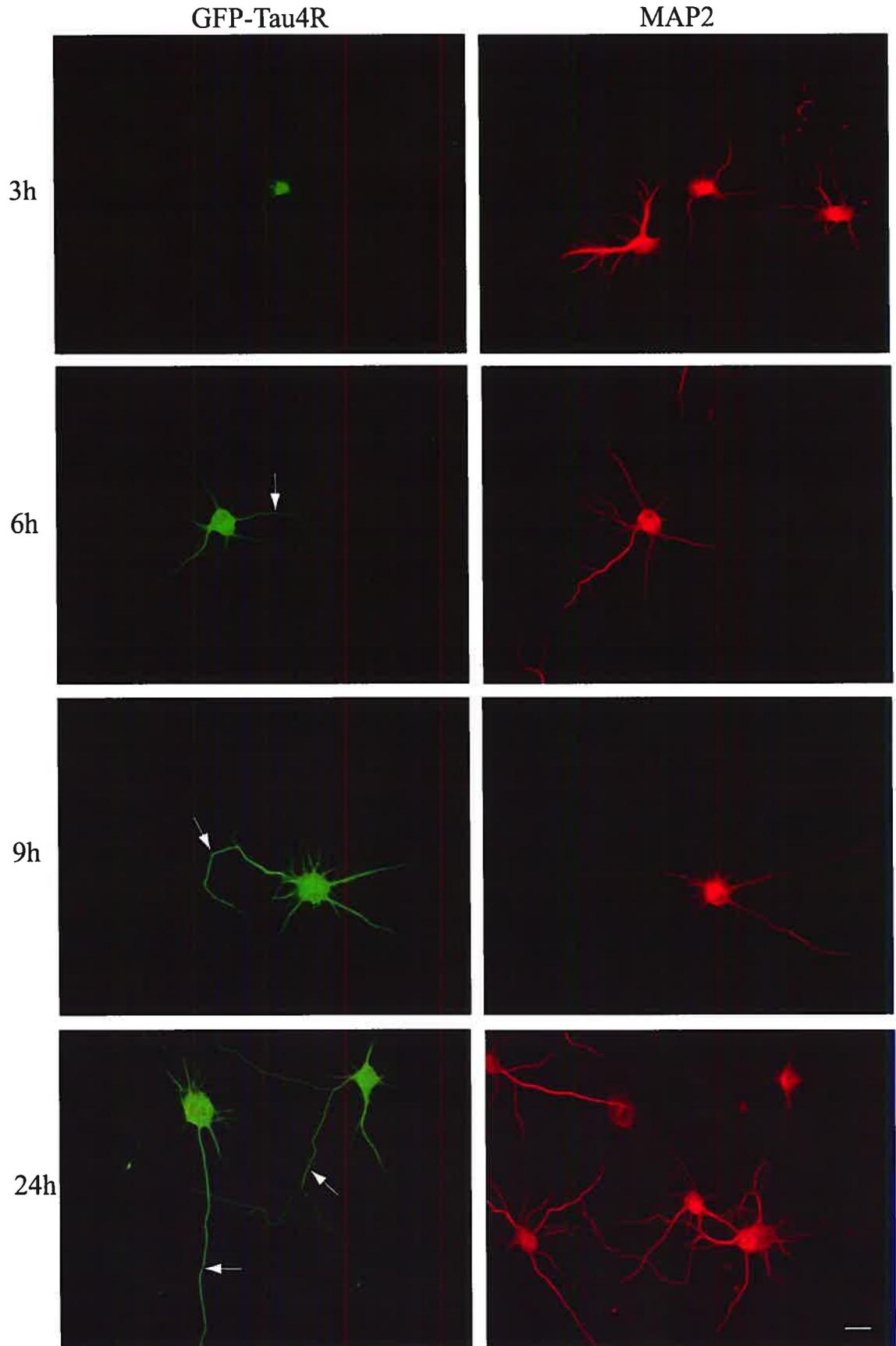
Un autre aspect important a été observé chez la majorité des neurones transfectés avec GFP-Tau4R. Il s'agit du fait que plus les neurones surexprimaient la protéine tau, moins le marquage de MAP2 était visible (Figure 15, 24h, p. 74), allant même parfois jusqu'à disparaître. Comme tau était fusionnée à la protéine GFP, les neurones ont également été transfectés avec GFP seule, afin de vérifier si ce phénomène était imputable à sa présence. Cependant, le marquage de MAP2 demeurait inchangé dans les neurones transfectés avec GFP seule (résultats non montrés). Il semble donc que la surexpression de la protéine tau ait entraîné une perte de la protéine MAP2 dans les neurones en culture.

### **3.3.2. Distribution uniforme de GFP-Tau4R déphosphorylée dans tous les compartiments cellulaires**

Comme ce fut le cas pour la protéine tau endogène, l'état de phosphorylation de tau exogène a également été vérifié par immunocytochimie. Après la transfection avec GFP-Tau4R, les neurones ont donc été marqués avec l'anticorps Tau-1 (Figure 16, p. 77), qui reconnaît un épitope déphosphorylé de tau peu importe l'origine de la protéine (humaine ou de rat). Ainsi, les neurones transfectés (tau exogène humaine) et non transfectés (tau endogène de rat) ont été marqués par cet anticorps. Tel qu'observé précédemment, la protéine tau endogène déphosphorylée aux sites reconnus par Tau-1 dans les neurones

**Figure 15. Distribution de la protéine tau exogène humaine (GFP-Tau4R) dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après différentes périodes d'expression.**

Les neurones en culture ont été transfectés avec GFP-Tau4R (en vert) au jour 7 de leur développement. Ils ont été fixés après des temps d'expression de 3, 6, 9 et 24 heures (h) et marqués avec l'anticorps PolyMAP2 (en rouge). La protéine tau exogène non mutée commence par remplir le corps cellulaire des neurones transfectés et plus le temps d'expression avance plus elle remplit les prolongements cytoplasmiques, les dendrites autant que l'axone. À noter qu'à 24 heures d'expression, le marquage de MAP2 est nettement moins intense dans les neurones qui surexpriment tau que dans ceux qui ne sont pas transfectés. Les flèches désignent les axones des neurones transfectés. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .



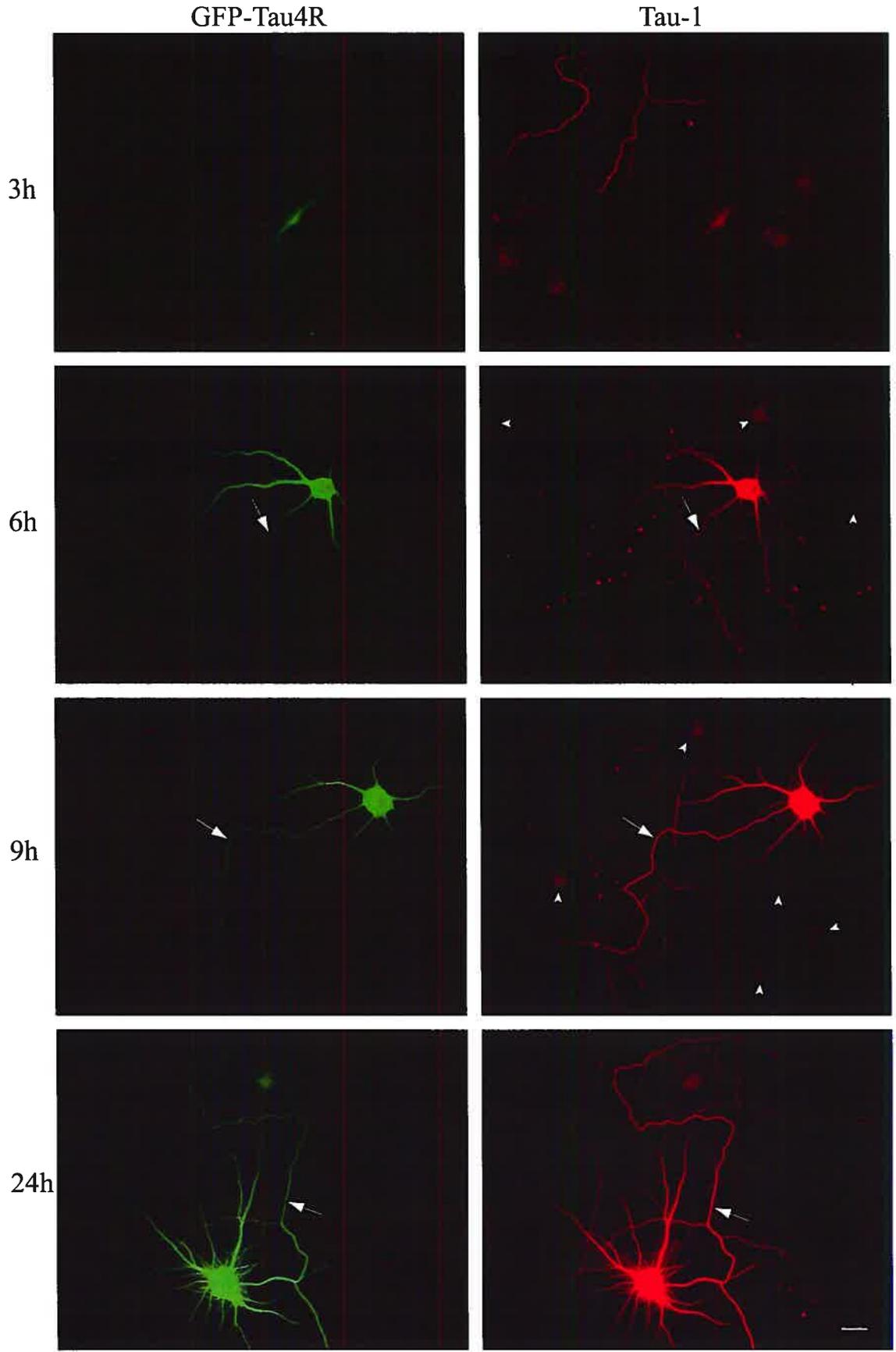
de sept jours était principalement localisée dans l'axone (Figure 13, p. 68 et Figure 16, 3h, p. 77). À trois heures d'expression, alors que les neurones transfectés n'exprimaient que faiblement GFP-Tau4R, le marquage obtenu avec Tau-1 correspondait donc principalement à celui de la protéine tau endogène déphosphorylée de rat, avec un enrichissement dans l'axone. Cependant, à partir de six heures d'expression, on distinguait clairement la protéine tau exogène humaine déphosphorylée dans tous les compartiments des neurones transfectés. Les corps cellulaires étaient intensément marqués contrairement à ceux des neurones non transfectés (pointes de flèches) dans lesquels la présence de tau endogène déphosphorylée était quasi imperceptible. En fait, le marquage obtenu avec Tau-1 dans les neurones transfectés concordait parfaitement avec la distribution de l'ensemble de GFP-Tau4R. Ceci indique qu'une partie importante de la protéine tau exogène est déphosphorylée, peu importe sa localisation dans le neurone. Elle n'est donc pas enrichie dans l'axone et ne présente aucun gradient proximo-distal, contrairement à ce qui était observé dans le cas de la protéine tau endogène déphosphorylée de rat (Figure 13, p. 68). La distribution de la protéine tau humaine transfectée et déphosphorylée à l'épitope de Tau-1 n'est donc pas représentative de celle obtenue pour tau endogène, tout comme l'ensemble de GFP-Tau4R ne se distribue pas comme la protéine tau endogène totale, c'est-à-dire principalement dans l'axone (Figure 12, p. 65).

### **3.3.3. Distribution de GFP-Tau3R identique à celle de GFP-Tau4R**

Comme la distribution de la protéine tau exogène normale ne concordait pas avec celle de tau endogène, nous avons vérifié si le fait d'exprimer une isoforme adulte de tau (GFP-Tau4R) dans des cultures de neurones embryonnaires pouvait être en cause. Les neurones ont donc été transfectés avec l'isoforme fœtale humaine de tau fusionnée en N-terminal à la GFP, GFP-Tau3R (voir Tableau V, p.40). La distribution de cette isoforme s'est cependant avérée être tout à fait similaire à celle de l'isoforme adulte GFP-Tau4R (comparer Figure 17, GFP-Tau3R, p. 80 et Figure 15, GFP-Tau4R, p. 74). En effet, GFP-Tau3R est d'abord apparue dans le corps cellulaire puis s'est progressivement étendue à tous les prolongements cytoplasmiques à mesure que le temps d'expression augmentait.

**Figure 16. Distribution de la protéine tau exogène humaine (GFP-Tau4R) déphosphorylée dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après différentes périodes d'expression.**

Les neurones transfectés avec GFP-Tau4R (en vert) au jour 7 ont été fixés après des temps d'expression de 3, 6, 9 et 24 heures (h) et marqués avec l'anticorps dépendant Tau-1 (en rouge). Le marquage obtenu avec Tau-1 dans les neurones transfectés concorde parfaitement avec la distribution de l'ensemble de la protéine tau exogène, visualisée grâce à la fluorescence de la GFP fusionnée à Tau4R. La protéine tau exogène déphosphorylée se retrouve donc dans tous les compartiments cellulaires du neurone à partir de 6 heures d'expression. Les flèches désignent les axones des neurones transfectés. Les pointes de flèches indiquent les corps cellulaires des neurones non transfectés marqués avec Tau-1. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .



### 3.3.4. Distribution de GFP-Tau3R phosphorylée dans le compartiment somato-dendritique

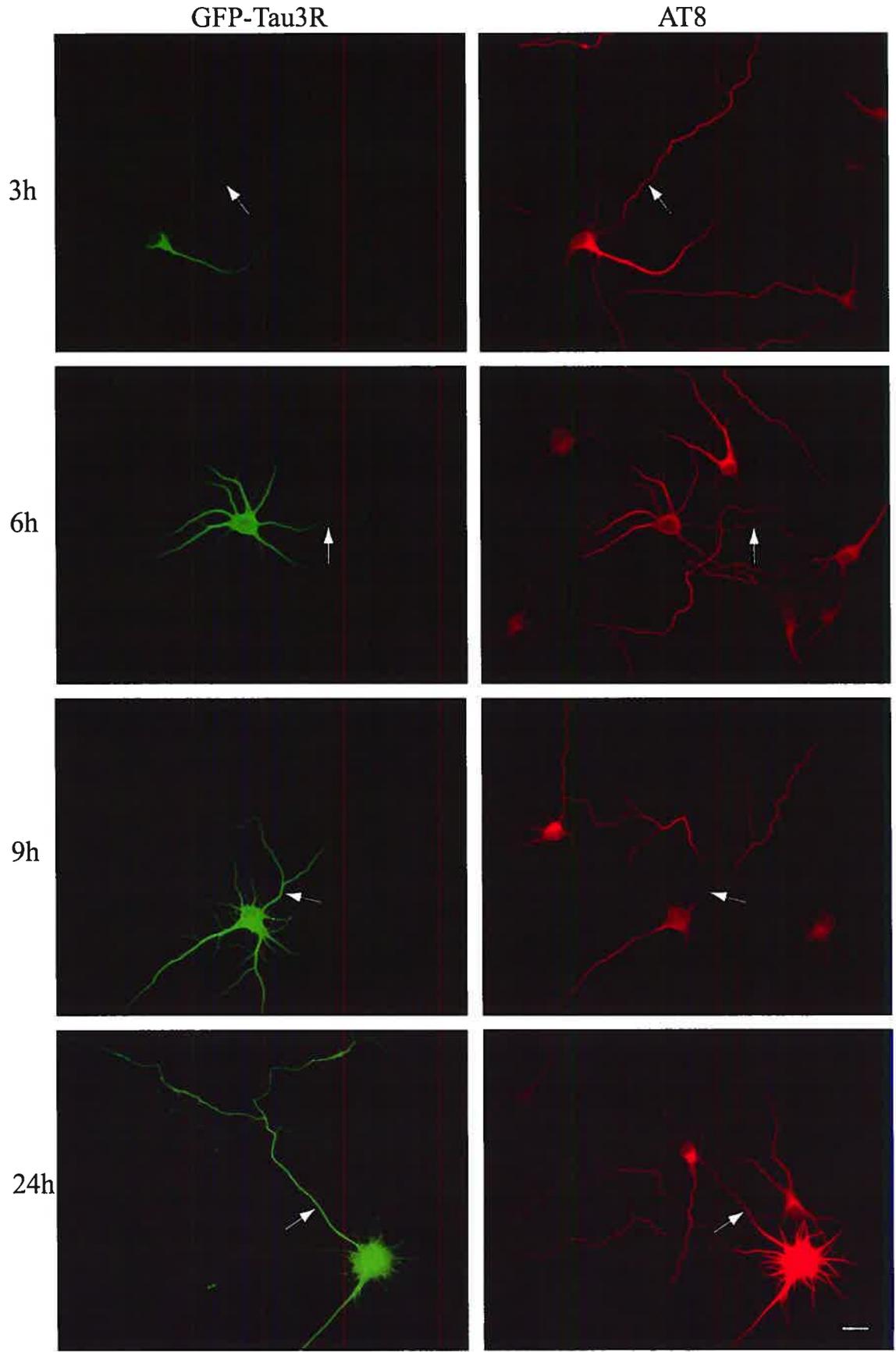
Comme nous l'avions fait pour la protéine tau endogène, nous avons également vérifié la distribution de tau exogène phosphorylée. Les neurones transfectés avec GFP-Tau3R ont donc été marqués avec l'anticorps phospho-dépendant AT8, qui marque autant la protéine tau endogène qu'exogène (Figure 17, p. 80). Un marquage dans tous les compartiments cellulaires a donc été retrouvé dans les neurones non transfectés, de même qu'un gradient proximo-distal dans certains axones, comme cela avait été observé précédemment (Figure 14, p. 70). On a également observé ce type de marquage dans les neurones transfectés qui exprimaient faiblement la protéine exogène (Figure 17, 3 et 6h, p. 80). Toutefois, plus le niveau d'expression de GFP-Tau3R dans les neurones transfectés augmentait et plus la protéine exogène remplissait les prolongements cytoplasmiques, plus l'aspect du marquage avec AT8 changeait et moins il reflétait la distribution de l'ensemble de GFP-Tau3R. À neuf heures d'expression, le corps cellulaire était marqué avec AT8 mais seules quelques dendrites l'étaient encore sur toute leur longueur, alors que GFP-Tau3R remplissait complètement ces deux compartiments. De plus, il était encore possible d'observer un gradient proximo-distal de tau dans l'axone avec AT8, alors que GFP-Tau3R n'avait pas encore atteint cette partie de l'axone. Ceci nous indique que le marquage obtenu avec AT8 dans l'axone désigne la protéine tau endogène phosphorylée.

Quand les neurones exprimaient très fortement GFP-Tau3R (24h), le marquage avec AT8 était concentré dans le corps cellulaire et le début des prolongements. Cette fois, seule la partie proximale de l'axone était marquée, alors que GFP-Tau3R atteignait la portion distale de l'axone. Ceci signifie que la protéine tau endogène phosphorylée était disparue de l'axone et que GFP-Tau3R n'était pas phosphorylée (à l'épitope reconnu par AT8) dans la partie distale de l'axone. Il semble donc que la surexpression de la protéine tau exogène entraîne une accumulation de sa forme phosphorylée au niveau du corps cellulaire et des dendrites, qui adoptent alors un aspect très hérissé tout autour du corps. Le marquage avec l'anticorps AT8 nous a également permis de constater que la distribution de GFP-Tau3R phosphorylée n'est pas identique à celle de l'ensemble de la protéine, comme c'était le cas pour la protéine tau exogène déphosphorylée marquée avec l'anticorps Tau-1 (Figure 16, p. 77).

**Figure 17. Distribution de la protéine tau exogène fœtale humaine (GFP-Tau3R) phosphorylée dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après différentes périodes d'expression.**

Les neurones transfectés avec GFP-Tau3R (en vert) à jour 7 ont été fixés après des temps d'expression de 3, 6, 9 et 24 heures (h) et marqués avec l'anticorps phospho-dépendant AT8 (en rouge). La protéine tau exogène fœtale commence par remplir le corps cellulaire des neurones et plus le temps d'expression avance plus elle remplit les prolongements cytoplasmiques, les dendrites autant que l'axone. Le marquage obtenu avec AT8 dans les neurones transfectés est concentré dans le corps cellulaire à 24 heures d'expression, contrairement à la distribution de l'ensemble de GFP-Tau3R. La protéine tau exogène fœtale phosphorylée s'accumule donc au niveau du corps cellulaire et des dendrites, qui adoptent un aspect très hérissé tout autour du corps, et elle est absente de l'axone sauf dans sa partie proximale. Les flèches désignent les axones des neurones transfectés. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .





### 3.4. CAUSES POSSIBLES DE LA DISTRIBUTION INADÉQUATE DE TAU EXOGÈNE : HYPOTHÈSES VÉRIFIÉES

Tel qu'observé lors de la caractérisation de leur distribution, les protéines tau exogènes ne se répartissent pas principalement dans l'axone comme la protéine tau endogène, ce qui soulève un problème. Si l'isoforme normale de tau exogène utilisée pour générer tous les mutants de tau ne se distribue pas comme son homologue endogène dès le départ, comment allons-nous pouvoir étudier l'effet des mutations sur la distribution de la protéine ? Nous avons alors envisagé plusieurs hypothèses afin d'élucider la cause de cette distribution inadéquate. Comme les isoformes fœtale (GFP-Tau3R) et adulte (GFP-Tau4R) employées se sont distribuées exactement de la même manière, cette première éventualité comme source potentielle du problème a été écartée.

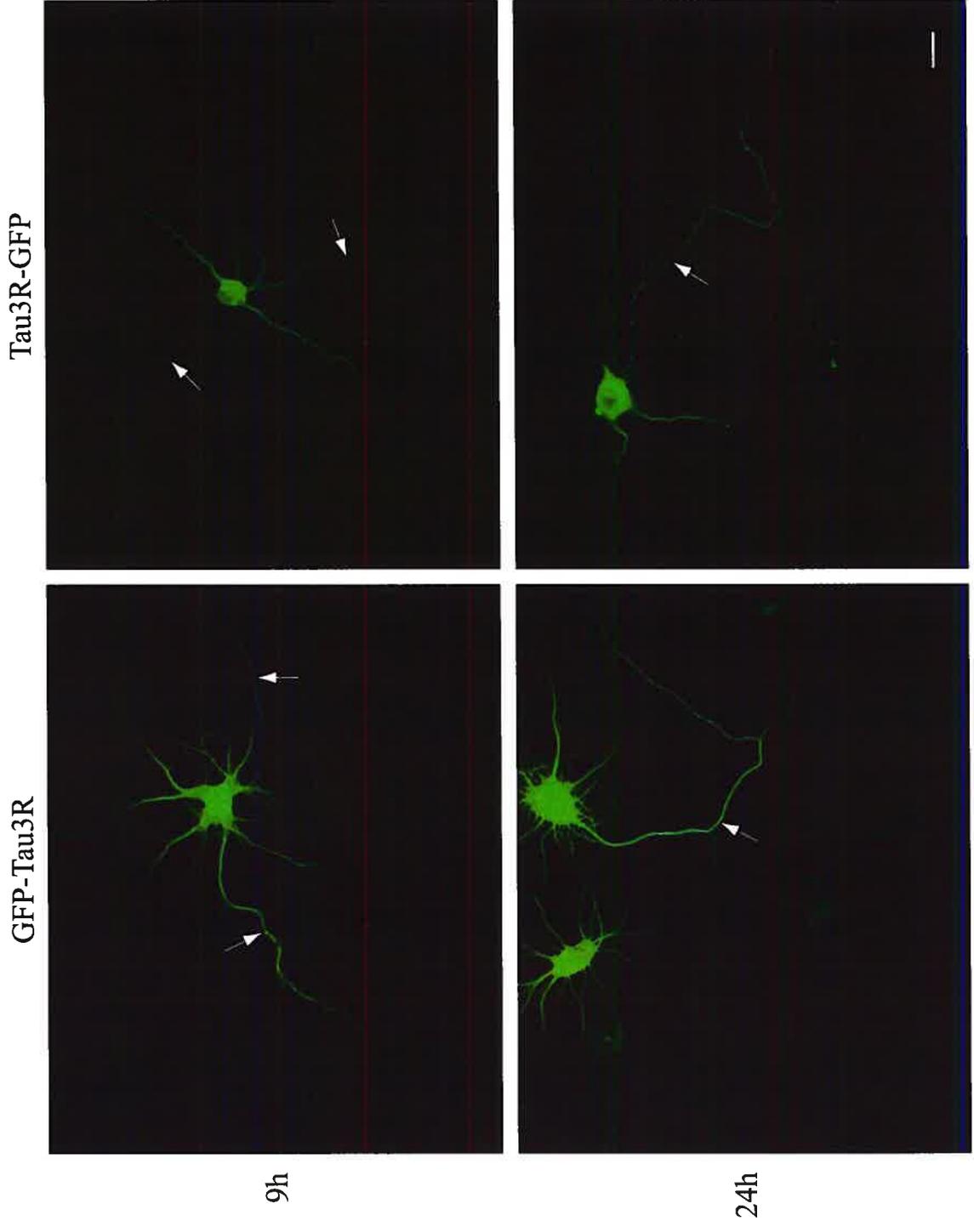
#### 3.4.1. Effet de la position du « tag » GFP : 5' vs 3'

Récemment, Lee *et al.* (2004) ont démontré que lorsqu'ils transfectaient des neurones avec Tau3R fusionnée en N-terminal à la GFP (GFP-Tau3R), l'anticorps phospho-dépendant qu'ils utilisaient ne fonctionnait pas, alors que s'ils transfectaient la même protéine mais avec la GFP en C-terminal (Tau3R-GFP), l'anticorps reconnaissait son épitope phosphorylé. Ceci indique que certains sites de phosphorylation pourraient être masqués par la présence de la GFP. Pour vérifier si la position du « tag » GFP pouvait nuire à la bonne distribution de la protéine tau exogène dans les neurones, ceux-ci ont été transfectés avec cette même construction de la protéine tau fœtale fusionnée en 3' à la GFP, Tau3R-GFP. Les résultats ont cependant démontré que la répartition de Tau3R-GFP dans les neurones était la même que celle de GFP-Tau3R, c'est-à-dire dans tous les compartiments cellulaires et de plus en plus loin dans l'axone à mesure que le temps d'expression augmentait (Figure 18, p. 83). La position de la GFP ne semblait donc pas influencer la distribution de la protéine tau exogène dans les neurones en culture. À noter que certaines cellules présentent deux axones. Ce phénomène est connu chez les neurones en culture (Banker and Cowan, 1979; Mandell and Banker, 1996a; Goslin *et al.*, 1998).

Le fait que la fluorescence de Tau3R-GFP était moins intense que celle de GFP-Tau3R pourrait refléter une expression moins importante de la protéine, mais pourrait aussi être dû simplement au « tag » GFP lui-même. En effet, le vecteur utilisé n'était pas le

**Figure 18. Distribution de la protéine tau exogène fœtale humaine fusionnée à la GFP en 5' (GFP-Tau3R) et en 3' (Tau3R-GFP) dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture.**

Les neurones ont été transfectés au jour 7 de leur développement avec GFP-Tau3R (à gauche) et Tau3R-GFP (à droite). Les temps d'expression de 9 et 24 heures (h) sont montrés. La protéine tau exogène fœtale est distribuée de la même façon dans les neurones, que la GFP y soit fusionnée en N-terminal ou en C-terminal. Elle se retrouve dans tous les compartiments cellulaires du neurone et plus le temps d'expression avance plus elle remplit les prolongements cytoplasmiques, les dendrites autant que l'axone. Les flèches désignent les axones des neurones transfectés. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .



même pour chacune des constructions (voir Tableau V, p. 40) : GFP-Tau3R était dans le vecteur pEGFP-C1 (« enhanced green fluorescent protein »), qui code pour un variant optimisé de la GFP produisant une fluorescence plus intense, alors que Tau3R-GFP était dans pGFP-C2, un plasmide codant pour la GFP traditionnelle. Cependant, ces deux vecteurs utilisent le même promoteur (CMV). Peu importe la raison de cette fluorescence moins intense, elle ne semble pas avoir influencé la distribution de la protéine.

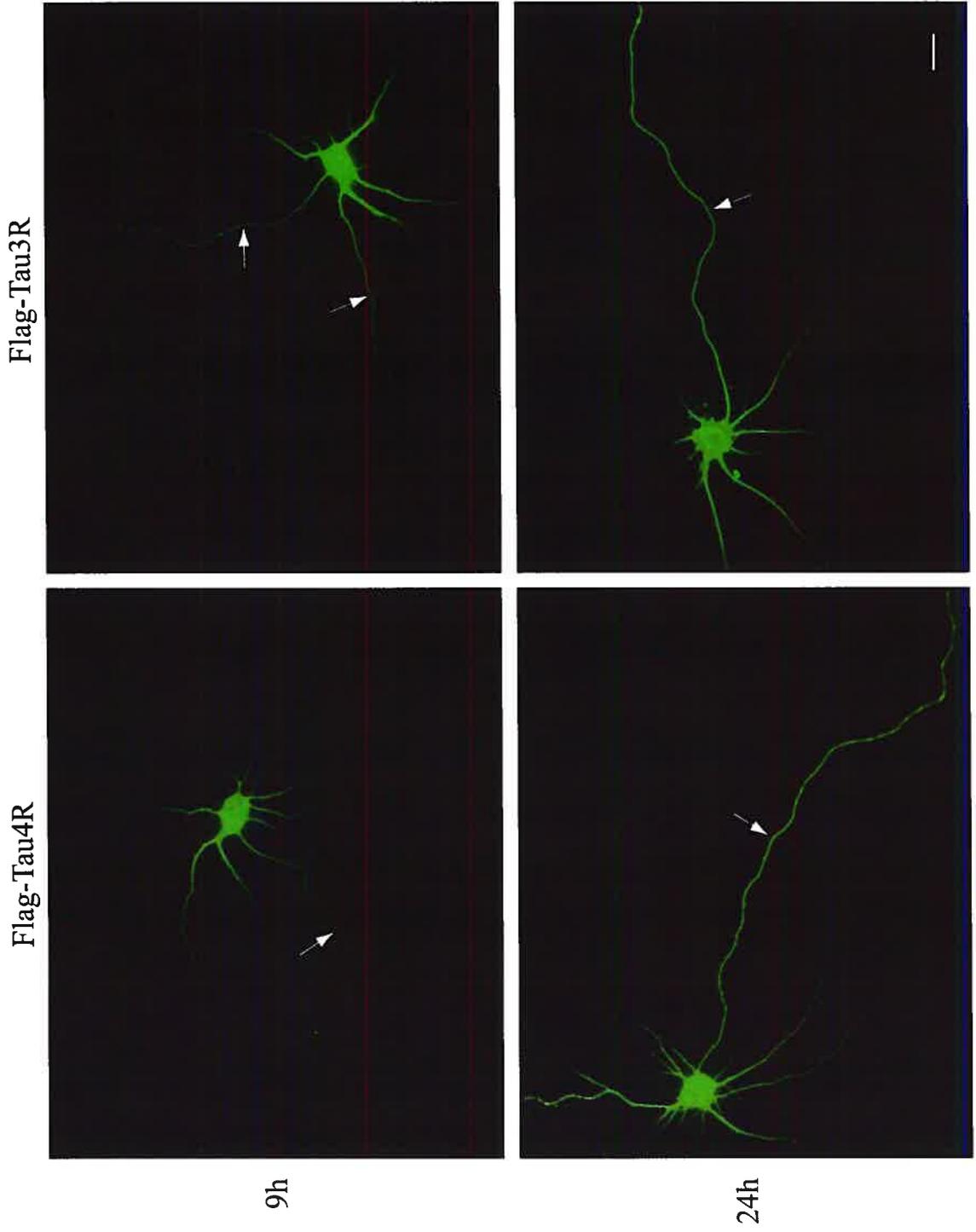
### 3.4.2. Effet de la longueur du « tag » : GFP vs Flag

Bien qu'aucune différence n'ait été observée entre la distribution de GFP-Tau3R et de Tau3R-GFP, il importait tout de même de vérifier si le problème de localisation de la protéine tau exogène pouvait être dû à la GFP. La séquence codant pour cette protéine fait près de 800 pb et constitue donc un très long « tag », surtout si l'on tient compte du fait que la protéine tau fait à peine plus de 1 Kb (1 149 pb pour l'isoforme Tau4R et 1 056 pb pour l'isoforme Tau3R). Peut-être que la GFP adopte une conformation tridimensionnelle qui masque certains sites de phosphorylation de la protéine tau, comme l'ont suggéré Lee *et al.* (2004), et que cela nuit au processus permettant à la protéine de se répartir comme elle le devrait au sein du neurone. Cette hypothèse a donc été vérifiée en transfectant les neurones avec les mêmes isoformes de tau, mais fusionnées cette fois à Flag en N-terminal (Flag-Tau4R et Flag-Tau3R), un « tag » beaucoup plus petit. La séquence en acides aminés de ce dernier est MDYKDDDDK (Hopp *et al.*, 1988; Prickett *et al.*, 1989). Il ne fait donc que 27 pb et ne risque pas de nuire à la protéine tau.

L'expression de Flag-Tau4R (adulte) et de Flag-Tau3R (fœtale) a été vérifiée de 3 à 24 heures, mais comme leur distribution s'est avérée identique à celle de toutes les autres constructions de tau exogène observées, seuls les temps d'expression de 9 et 24 heures sont montrés (Figure 19, p. 86). Même fusionnées à Flag, les protéines tau exogènes fœtales et adultes se sont encore une fois réparties uniformément dans tous les compartiments cellulaires des neurones transfectés après s'être distribuées de plus en plus loin dans l'axone à mesure que le temps d'expression augmentait.

**Figure 19. Distribution des protéines tau exogènes humaines fœtales (Tau3R) et adultes (Tau4R) fusionnées à Flag en N-terminal dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture.**

Les neurones ont été transfectés au jour 7 de leur développement avec Flag-Tau4R (à gauche) et Flag-Tau3R (à droite). Les protéines ont été visualisées grâce au marquage avec l'anticorps HT7, qui reconnaît seulement la forme humaine de tau. Les temps d'expression de 9 et 24 heures (h) sont montrés. Peu importe l'isoforme, les protéines tau exogènes sont distribuées de la même façon dans les neurones. Elles se retrouvent dans tous les compartiments cellulaires et plus le temps d'expression avance plus elles remplissent les prolongements cytoplasmiques, les dendrites autant que l'axone. Les flèches désignent les axones des neurones transfectés. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .



### **3.4.3. Effet de l'espèce de la protéine : humain vs rat**

Toujours dans le but d'élucider le problème de distribution de tau exogène, l'espèce de la protéine tau a été vérifiée. Comme les neurones en culture proviennent d'embryons de rats, peut-être que le fait d'exprimer la protéine tau humaine dans ce système cellulaire de rats est responsable du problème. Autrement dit, peut-être que les neurones de rats ne possèdent pas toutes les kinases et les phosphatases nécessaires pour que la protéine tau humaine subisse sa cascade de phosphorylation habituelle, nuisant ainsi à sa distribution adéquate dans le neurone.

Les neurones ont donc été transfectés avec l'isoforme adulte de tau provenant du rat, Rat-Tau4R (Figure 20, p. 89). Après une expression de 24 heures, la protéine a été visualisée à l'aide de l'anticorps PolyTau car elle n'était fusionnée à aucun « tag ». Les protéines tau endogènes étaient également marquées par cet anticorps et comme nous l'avions observé précédemment (Figure 12, p. 65), le marquage dans les neurones non transfectés était principalement axonal et les corps cellulaires étaient très pâles (pointes de flèches). Cependant, les neurones qui surexprimaient Rat-Tau4R présentaient un marquage beaucoup plus intense. Il est donc difficile de bien distinguer et de suivre les axones des neurones non transfectés sur la figure 20 (p. 89) puisque l'ajustement de l'image a été fait en fonction du neurone transfecté, beaucoup plus fortement marqué. Les résultats ont démontré que même la protéine tau de rat occupait tous les compartiments cellulaires du neurone et ce de façon uniforme. Sa distribution était donc tout à fait similaire à celle de la protéine tau humaine fusionnée à la GFP. Il aurait été assez surprenant que l'espèce soit la cause du problème, mais il fallait tout de même écarter cette possibilité.

### **3.4.4. Effet du temps d'expression de la protéine : apparition d'un gradient proximo-distal de tau dans l'axone à 48 heures**

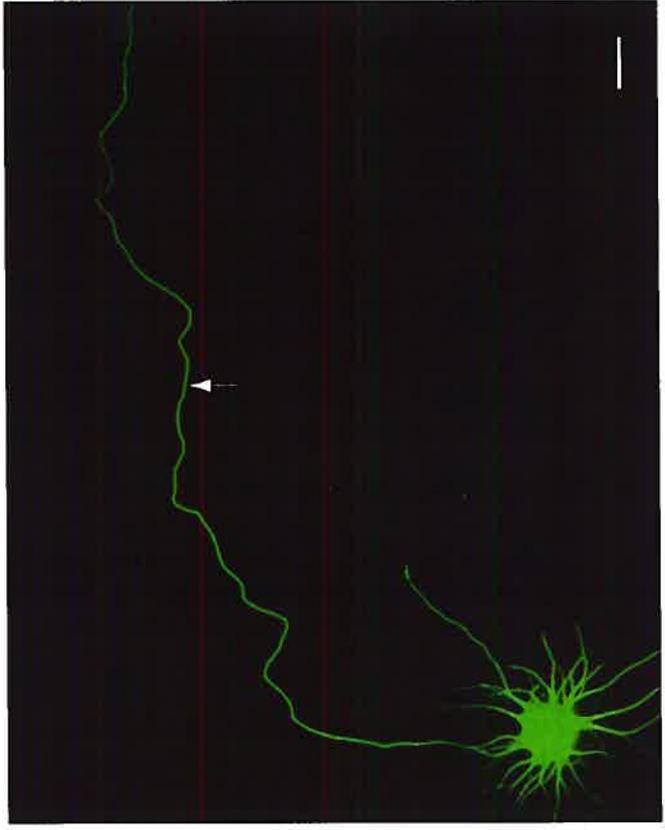
Comme toutes les hypothèses précédentes n'avaient pas su expliquer la distribution uniforme des protéines tau exogènes, celles-ci ont été exprimées dans les neurones mais pendant des périodes plus longues. Jusqu'ici, le temps d'expression maximal avait été de 24 heures. Peut-être était-ce insuffisant pour permettre une distribution adéquate de la protéine. Les neurones ont donc été transfectés avec les deux mêmes isoformes de tau (Tau3R et Tau4R) fusionnées à la GFP et à Flag, mais ont été fixés après 48 heures



**Figure 20. Distribution de l'isoforme adulte de la protéine tau exogène de rat (Rat-Tau4R) dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture.**

Les neurones ont été transfectés au jour 7 de leur développement avec Rat-Tau4R (à gauche) et ont été comparés à ceux transfectés avec la protéine tau humaine, GFP-Tau4R (à droite). Après 24 heures (h) d'expression, l'anticorps PolyTau a été utilisé pour visualiser Rat-Tau4R dans les neurones transfectés. Cet anticorps reconnaît toutes les formes de tau, qu'elles soient endogènes ou exogènes, mais les neurones transfectés sont beaucoup plus marqués. Peu importe l'espèce de la protéine tau exogène, elles sont distribuées de la même façon dans les neurones. Elles se retrouvent de façon équivalente dans tous les compartiments cellulaires. Les flèches désignent les axones des neurones transfectés. Les pointes de flèches montrent les corps cellulaires des neurones non transfectés, qui sont faiblement marqués avec PolyTau. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

GFP-Tau4R



Rat-Tau4R



24h

d'expression (Figure 21, p. 92). Dans plusieurs neurones démontrant une expression moins intense de la protéine tau exogène, un gradient proximo-distal est apparu dans l'axone, ce qui n'avait jamais été observé auparavant. Le corps cellulaire et les dendrites contenaient encore la protéine et, même si la partie proximale de certains axones était encore marquée, la portion distale l'était davantage. Ce gradient était visible autant avec l'isoforme adulte que fœtale et ce, peu importe le « tag » avec lequel tau était fusionnée. De plus, certains neurones possédant deux axones montraient le gradient dans ces deux prolongements, comme le neurone exprimant Flag-Tau3R présenté à la figure 21 (p. 92). L'expression de certaines constructions de tau a également été vérifiée après 72 heures et des résultats similaires ont été observés, toujours dans les neurones qui exprimaient moins fortement la protéine (résultats non montrés). Le temps d'expression semblait donc avoir un certain effet sur la distribution de la protéine tau exogène.

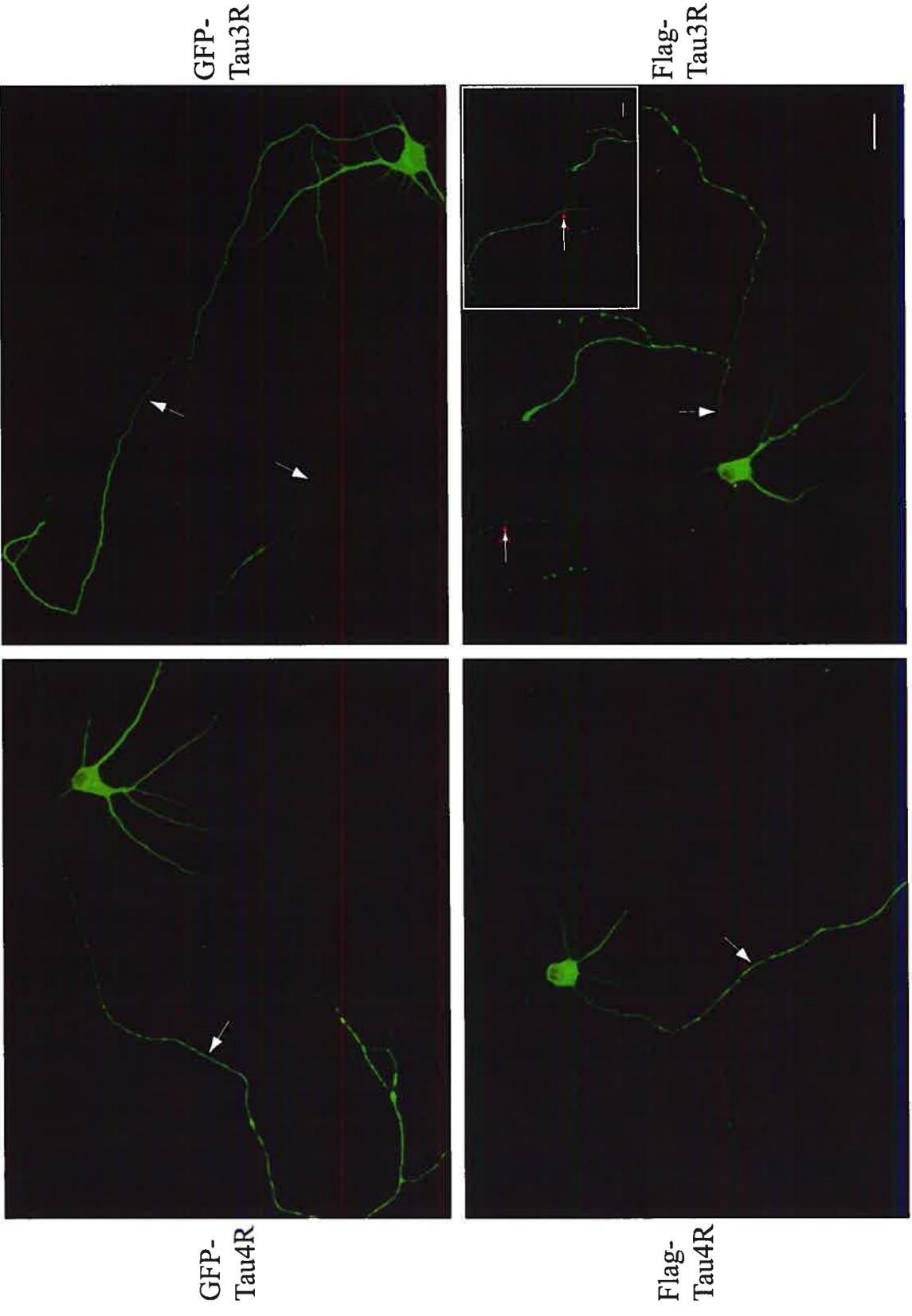
### **3.5. DISTRIBUTION DES PROTÉINES TAU MUTANTES**

#### **3.5.1. Distribution uniforme des mutants de tau dans tous les compartiments cellulaires**

Malgré les problèmes de distribution de la protéine tau exogène rencontrés, plusieurs mutants ont tout de même été transfectés dans les neurones. Selon l'hypothèse de départ, qui était de vérifier si l'hyperphosphorylation de tau entraîne son accumulation au niveau du compartiment somato-dendritique, les protéines tau dont les sérines et thréonines ont été converties en glutamate (qui mime la phosphorylation) auraient dû se retrouver dans le corps cellulaire et les dendrites, alors que celles mutées en alanine (forme non phosphorylable) auraient dû être concentrées au niveau de l'axone. Ce n'est toutefois pas ce qui a été observé. Les mutants contenant douze sites mutés en glutamate ou en alanine commençaient d'abord par remplir le corps cellulaire et le début des prolongements cytoplasmiques, puis se retrouvaient toujours de plus en plus loin dans ces derniers à mesure que le temps d'expression augmentait (Figure 22, p. 95). Le même phénomène a été observé dans le cas des mutants qui contenaient un plus petit nombre de sites mutés (résultats non montrés). Les protéines tau mutées en glutamate ou en alanine se distribuaient donc exactement comme toutes les autres protéines tau exogènes exprimées dans les neurones en culture.

**Figure 21. Distribution des différentes constructions de la protéine tau exogène dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après 48 heures d'expression.**

Les neurones ont été transfectés au jour 7 de leur développement avec les protéines tau humaines GFP-Tau4R (en haut à gauche), GFP-Tau3R (en haut à droite), Flag-Tau4R (en bas à gauche) et Flag-Tau3R (en bas à droite). Elles ont été exprimées pendant 48 heures (h), après quoi les neurones transfectés avec Flag-Tau4R et Flag-Tau3R ont été marqués avec l'anticorps HT7, qui reconnaît la forme humaine de tau. Peu importe la construction de la protéine tau exogène, il est possible d'observer des neurones qui présentent un gradient proximo-distal de tau dans l'axone (identifié par les flèches), lorsqu'ils n'expriment pas la protéine trop fortement. Les protéines tau sont tout de même distribuées dans le corps cellulaire et les dendrites. Le neurone transfecté avec Flag-Tau3R qui est montré contient deux axones et possède le gradient dans les deux. Une seconde portion d'un de ces axones est montré dans le coin supérieur droit de la photo pour permettre de bien voir ce gradient. La flèche à la pointe rouge est positionnée au même endroit de l'axone sur les deux photos. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .



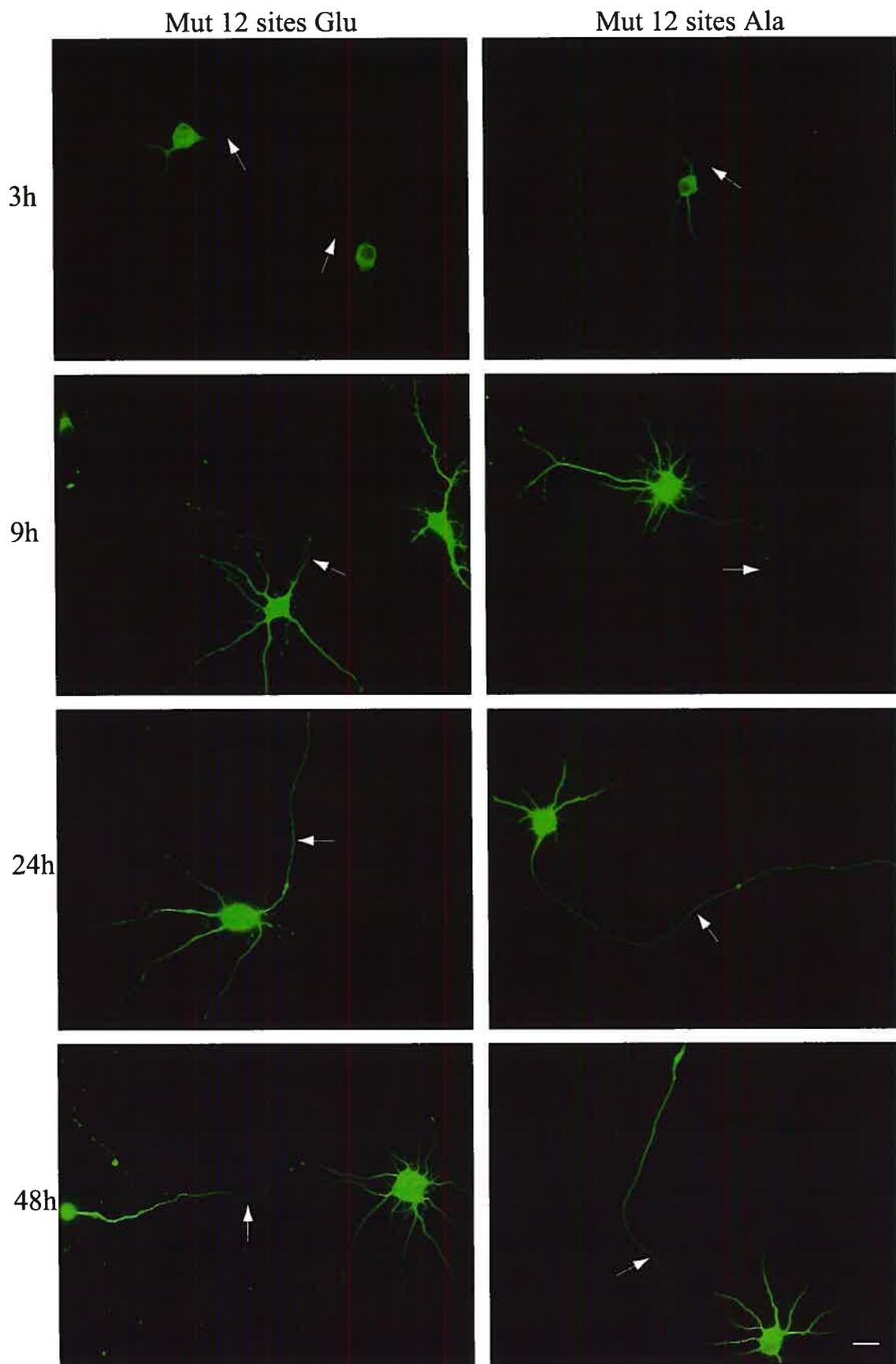
48h

### **3.5.2. Présence du gradient proximo-distal dans l'axone à 48 heures d'expression**

Comme cela avait été vérifié pour les isoformes de la protéine tau normale (Figure 21, p. 92), les protéines tau mutantes ont été exprimées dans les neurones durant des périodes de plus de 24 heures (Figure 22, p. 95). À 48 heures d'expression, il était également possible de distinguer des gradients proximo-distaux de tau dans l'axone de certains de ces neurones, bien que le compartiment somato-dendritique contenait toujours la protéine. Ce phénomène a également été observé à 72 heures d'expression (résultats non montrés). Les protéines tau mutantes se comportaient donc exactement comme les protéines tau exogènes normales, peu importe qu'elles aient été mutées en glutamate ou en alanine.

**Figure 22. Distribution des mutants de tau contenant 12 sites mutés en glutamate et en alanine dans les neurones de l'hippocampe de rat en culture, après différentes périodes d'expression.**

Les neurones ont été transfectés avec les mutants de la protéine tau humaine contenant 12 sites mutés en glutamate (Mut 12 sites Glu) et en alanine (Mut 12 sites Ala) au jour 7 de leur développement. Ils ont été fixés après des temps d'expression de 3, 9, 24 et 48 heures (h). Les protéines tau exogènes mutantes, glutamate et alanine, commencent par remplir le corps cellulaire des neurones transfectés et plus le temps d'expression avance plus elle remplissent les prolongements cytoplasmiques, les dendrites autant que l'axone. À 48 heures d'expression, un gradient proximo-distal de tau peut être observé dans l'axone de certains neurones transfectés avec l'un ou l'autre des mutants, mais le corps cellulaire et les dendrites demeurent marqués. Les flèches désignent les axones des neurones transfectés. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ .





## **4. DISCUSSION**

### **4.1. LES PROTÉINES TAU MUTANTES**

#### **4.1.1. Stratégie de « pseudohyperphosphorylation » de tau**

La stratégie qui consiste à muter des sites de phosphorylation d'une protéine en glutamate afin de mimer la phosphorylation s'est avérée très efficace dans le cas de plusieurs protéines (Maciejewski *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998). La pertinence de cette technique a également été confirmée pour tau puisqu'elle reproduit plusieurs des aspects structuraux et fonctionnels typiques des protéines tau hyperphosphorylées (Eidenmuller *et al.*, 2000; Maas *et al.*, 2000). Le choix de cette méthode, d'ailleurs couramment utilisée afin de déterminer le rôle potentiel de l'hyperphosphorylation de tau dans les tauopathies (Fath *et al.*, 2002; Amano *et al.*, 2003; Haase *et al.*, 2004), était donc tout à fait judicieux pour répondre à notre hypothèse, c'est-à-dire pour vérifier si l'hyperphosphorylation de tau entraîne son accumulation au niveau du compartiment somato-dendritique. Les résultats obtenus n'ont malheureusement pas été à la hauteur de nos attentes, mais la stratégie employée n'est aucunement remise en cause pour autant.

#### **4.1.2. Expression des mutants de tau**

Le niveau d'expression des protéines tau n'a pas été affecté par les mutations qui leur avaient été introduites, comme en témoigne la figure 11 (p. 62). Mais comparativement à la protéine tau normale, une augmentation du poids moléculaire a été observée à mesure que la protéine contenait un nombre croissant de sites mutés en glutamate (Glu) et une diminution lorsque les sites étaient mutés en alanine (Ala). Il est connu que les protéines tau recombinantes migrent moins rapidement sur un gel de polyacrylamide suite à leur phosphorylation (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992; Mulot *et al.*, 1994). Inversement, la déphosphorylation entraîne une augmentation de la mobilité des protéines tau sur gel (Mandell and Banker, 1996a). Les protéines tau mutantes présentaient donc ce même genre de patron de migration, c'est-à-dire une migration ralentie dans le cas des mutants qui mimaient la phosphorylation (Glu) et une migration plus rapide des formes mutantes non phosphorylables (Ala). Le ralentissement de la migration a d'ailleurs été observé par les autres équipes qui ont utilisé cette stratégie de « pseudohyper-

phosphorylation » de tau (Eidenmuller *et al.*, 2000; Fath *et al.*, 2002). Ceci serait causé par la charge négative et le changement conformationnel introduits par les acides aminés glutamate qui miment la phosphorylation (Haase *et al.*, 2004). Ces différences de mobilité sont abolies lorsque l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est faite en présence d'urée, indiquant ainsi qu'elles résultent de changements conformationnels qui produisent des domaines de tau résistants au détergent SDS chez les mutants Glu (Eidenmuller *et al.*, 2000, 2001). Des changements similaires avaient aussi été observés dans le cas de protéines tau hyperphosphorylées (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Brandt *et al.*, 1994).

Une autre possibilité pourrait expliquer ces changements de migration sur gel. Comme il a été démontré que la phosphorylation de tau à certains sites stimulait celle d'autres sites (Sengupta *et al.*, 1997; Zheng-Fischhofer *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2004), il se pourrait que le fait de mimer la phosphorylation avec le glutamate induise effectivement la phosphorylation d'autres sites de tau, se traduisant alors par une diminution de sa migration sur gel. Cette possibilité est d'ailleurs présentement à l'étude dans le laboratoire.

#### **4.1.3. Distribution uniforme des mutants de tau dans tous les compartiments neuronaux**

Même si la stratégie était pertinente et que l'expression des protéines mutantes était adéquate, leur distribution dans les neurones en culture était identique peu importe le type de mutants (Glu ou Ala) et la quantité de sites mutés. Selon l'hypothèse de départ, nous nous attendions plutôt à ce que les protéines tau dont les sérines et thréonines avaient été converties en glutamate (qui mime la phosphorylation) se retrouvent dans le compartiment somato-dendritique et que celles mutées en alanine (forme non phosphorylable) se concentrent au niveau de l'axone. Les deux types de mutants étaient pourtant distribués uniformément dans tous les compartiments du neurone (Figure 22, p. 95). Il était cependant impossible de conclure quoi que ce soit à partir de ces résultats car la protéine tau exogène normale (GFP-Tau4R), à partir de laquelle tous les mutants ont été produits, était également localisée uniformément dans les neurones (Figure 15, p. 74), contrairement à la protéine tau endogène qui était concentrée au niveau de l'axone (Figure 12, p. 65). Ce phénomène ne semblait donc pas imputable aux mutations.

## **4.2. LES PROTÉINES TAU EXOGÈNES NORMALES**

### **4.2.1. Distribution inadéquate : localisation uniforme dans tous les compartiments neuronaux**

Comme les protéines mutantes, les protéines tau normales transfectées commençaient par remplir le corps cellulaire des neurones et plus le temps d'expression augmentait plus elles remplissaient les prolongements cytoplasmiques, les dendrites comme l'axone. Cette distribution n'était cependant pas du tout représentative de celle observée dans le cas de la protéine tau endogène totale, qui était quant à elle enrichie dans l'axone (Figure 12, p. 65). Ce résultat était plutôt surprenant compte tenu du fait qu'aucun phénomène de ce genre n'avait été observé lors d'études antérieures réalisées avec la protéine MAP2, une autre MAP qui partage plusieurs similitudes avec tau. Cette protéine avait été fusionnée à la GFP dans le même vecteur que celui utilisé dans le cas de tau (pEGFP-C1) et par suite de sa transfection dans les neurones en culture, elle se distribuait exactement comme la protéine MAP2 endogène, soit dans le compartiment somato-dendritique (résultats non montrés). Puisque la protéine tau exogène normale ne se répartissait pas correctement par rapport à la protéine endogène, il est tout à fait probable que les protéines mutantes ne démontrent pas non plus le bon patron de distribution, empêchant ainsi toute conclusion valable. Il importait donc d'identifier les sources de cette discordance.

## **4.3. CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES**

### **4.3.1. Distribution de l'isoforme exogène fœtale de tau humaine identique à celle de l'isoforme adulte**

La première possibilité à écarter comme cause de ce problème était celle d'exprimer une isoforme adulte de tau (GFP-Tau4R) dans des cultures de neurones embryonnaires. Cette possibilité fut effectivement bien vite éliminée puisque l'isoforme fœtale de tau fusionnée à la GFP (GFP-Tau3R) dans le même vecteur que GFP-Tau4R se distribuait de la même façon que cette dernière, soit dans tous les compartiments neuronaux (Figures 15 et 17, p. 74 et 80).

#### **4.3.2. Aucun effet de la position ni de la présence du « tag » GFP sur la distribution de la protéine tau exogène humaine**

Lee *et al.* (2004) ont montré que la GFP pouvait interférer soit avec la phosphorylation de tau par la kinase fyn au site Tyr<sup>18</sup> soit avec la réactivité de leur anticorps phospho-dépendant lorsque tau était fusionnée en N-terminal à la GFP, alors que ce n'était pas le cas lorsque la GFP était liée en C-terminal. Puisque la protéine tau semblait distribuée différemment dans les neurones en culture selon son patron de phosphorylation, nous avons donc vérifié si la position de la GFP ou même la présence de ce « tag » volumineux pouvait nuire à la bonne distribution de la protéine tau exogène en masquant certains sites de phosphorylation. Cela ne s'est cependant pas avéré être le cas ici. La distribution de la protéine tau exogène était identique que la GFP fût liée à tau en 5' ou en 3' (Figure 18, p. 83). Dans l'étude de Lee *et al.* (2004), le site Tyr<sup>18</sup> est peut-être masqué en raison du fait qu'il est situé très près de l'extrémité N-terminale et donc de la GFP. Ces auteurs soulignent d'ailleurs que l'absence de réaction entre l'anticorps phospho-dépendant et tau ne semble pas provenir d'un problème de phosphorylation de la Tyr<sup>18</sup> mais plutôt d'un problème d'accessibilité de l'anticorps pour ce site phosphorylé à cause de la GFP en N-terminal.

Nous avons également observé que même en étant fusionnées à Flag, un très petit « tag » qui ne peut masquer aucun site de phosphorylation, les protéines tau exogènes fœtales et adultes se retrouvaient encore une fois uniformément réparties dans tous les compartiments cellulaires et atteignaient des portions de plus en plus distales de l'axone avec l'allongement de la durée d'expression (Figure 19, p. 86). Ces résultats nous confirmaient donc que la fusion de la protéine tau au « tag » GFP n'avait aucun effet sur sa distribution.

#### **4.3.3. Distribution de l'isoforme adulte de tau exogène de rat identique à celle de l'isoforme humaine**

Comme l'absence de polarisation de tau exogène dans l'axone ne semblait pas provenir de l'isoforme utilisée ni de la fusion à la GFP, nous avons vérifié si l'espèce de la protéine tau (humaine) transfectée dans des neurones de rats pouvait être en cause. Cependant, même la protéine tau exogène de rat (Rat-Tau4R) s'est répartie exactement

comme son homologue humain, GFP-Tau4R (Figures 15 et 20, p. 74 et 89). D'ailleurs, Rat-Tau4R n'était fusionnée à aucun « tag » et occupait tout de même tous les compartiments cellulaires du neurone, autre preuve que la fusion de tau à la GFP n'était pas responsable de ce patron de distribution.

#### **4.3.4. Augmentation de la durée d'expression de tau exogène et apparition d'un gradient proximo-distal dans l'axone**

Puisque la protéine tau exogène transfectée n'était pas plus enrichie dans l'axone après 24 heures qu'à 3 heures, nous avons prolongé l'expression jusqu'à 48 et 72 heures afin de vérifier si un certain temps était nécessaire pour permettre une distribution adéquate de la protéine. Nous avons alors constaté la présence d'un gradient proximo-distal de tau exogène dans l'axone de certains neurones, ce qui n'avait encore jamais été observé (Figure 21, p. 92). Ce gradient était visible autant avec l'isoforme adulte que fœtale et ce, peu importe le « tag » avec lequel tau était fusionnée (GFP ou Flag). Ces gradients sont cependant apparus seulement dans des neurones démontrant une expression moins intense de la protéine tau exogène. Celle-ci était tout de même présente dans le compartiment somato-dendritique de ces neurones.

Cette distribution nous rappelait donc celle de la protéine tau endogène dans les premiers stades de développement des neurones en culture, qui était alors dans tous les compartiments même si un gradient proximo-distal était présent dans l'axone (Figure 12, p. 65). Elle commençait seulement à se concentrer dans le compartiment axonal entre le jour 4 et le jour 7, après quoi son enrichissement dans l'axone était clairement établi. C'est pourquoi nous avons choisi de transfecter les neurones à ce moment. Comme nous nous attendions à ce que la protéine tau exogène se comporte de la même façon, il aurait alors été possible de visualiser un changement de distribution des protéines tau mutantes si tel avait été le cas. Mais vu les résultats obtenus, il vaudrait peut-être mieux transfecter les neurones à un moment plus précoce de leur développement et laisser à la protéine tau exogène le temps de subir les mêmes cascades de phosphorylation et de déphosphorylation que la protéine tau endogène a subi, afin de permettre également la polarisation de tau exogène dans l'axone.

#### 4.3.5. Surexpression de la protéine tau

Le fait que le gradient proximo-distal de tau exogène ne soit apparu que dans des neurones qui exprimaient faiblement cette protéine suggère la possibilité que l'expression de la protéine transfectée était beaucoup trop forte, l'amenant ainsi à des niveaux non physiologiques qui nuisaient alors à sa bonne distribution. Il semble effectivement que le fait de surcharger la cellule avec tau puisse mener à son apparition dans le corps cellulaire et les dendrites (Kanai and Hirokawa, 1995). Comme nous, Kanai et Hirokawa (1995) ont observé une distribution homogène de tau dans des cultures primaires de neurones de la moelle épinière de souris transfectées avec l'ADNc de tau (Rat-Tau4R). Mais contrairement à ce que nous avons observé, le marquage de tau avec l'anticorps Tau-1 dans ces neurones transfectés était similaire à celui de la protéine tau endogène, c'est-à-dire principalement axonal. Pourtant, dans nos neurones qui surexprimaient tau, le marquage de Tau-1 suivait exactement la distribution de l'ensemble des protéines tau exogènes, soit dans tous les compartiments neuronaux (Figure 16, p. 77). Plusieurs possibilités peuvent expliquer ces résultats discordants. D'abord, le système cellulaire utilisé était différent du nôtre (neurones de la moelle épinière en co-culture avec des cellules gliales vs neurones de l'hippocampe). Nous avons effectivement constaté des différences dans la distribution de tau dans des neurones de l'hippocampe en co-culture avec des cellules gliales ou cultivés en présence du supplément B27 uniquement, comme il en sera question plus loin. De plus, le moment de la transfection (J12 vs J7), le temps d'expression (5 jours vs 24 heures), de même que le promoteur utilisé ( $\beta$ -actine vs CMV) étaient différents.

Comme le niveau d'expression de tau exogène dépend principalement du promoteur utilisé, celui-ci est sans aucun doute un facteur important à considérer pour expliquer la distribution uniforme de tau exogène. En effet, le promoteur contenu dans les vecteurs d'expression de toutes les constructions d'ADNc de tau utilisées est le CMV, un promoteur fort. Toutes les protéines tau exogènes étaient donc exprimées à de forts niveaux, tous comparables les uns aux autres quand un nombre similaire de plasmides est incorporé dans les neurones. Ces protéines étaient alors probablement trop nombreuses pour permettre leur distribution adéquate au sein du neurone. Dans notre étude, il faudrait donc remplacer le promoteur CMV par un autre plus faible ou par un promoteur inductible, afin d'exprimer les protéines tau exogènes à des niveaux plus physiologiques.

#### 4.3.6. Utilisation de la séquence 3'UTR de tau pour obtenir une localisation axonale

Une autre modification devra probablement être apportée à nos constructions de tau afin de permettre leur enrichissement dans l'axone. Il semble en effet que la localisation de tau dans l'axone dépend de la présence d'un signal *cis* de ciblage axonal contenu dans la région 3' non traduite (3'UTR) de son ARNm (Aronov *et al.*, 2001). D'ailleurs, si on remplace ce signal par le signal de ciblage dendritique de MAP2 (DTE), la protéine tau se retrouve alors dans les dendrites de cellules P19 différenciées en cellules neuronales. Inversement, la substitution du signal DTE de MAP2 par le signal de localisation axonale de tau entraîne l'apparition de MAP2 dans l'axone (Aronov *et al.*, 2001). Ginzburg et son équipe ont également montré que ce signal de 240 paires de bases est nécessaire pour permettre le transport de l'ARNm de tau dans l'axone, après quoi une traduction locale en protéines a lieu. L'ARNm de tau voyagerait le long des MTs sous forme de structures granulaires contenant également la protéine de liaison à l'ARN HuD, qui stabilise l'ARNm en se liant au signal *cis* de ciblage axonal, et la protéine KIF3A (Aronov *et al.*, 2001, 2002), un membre de la famille des kinésines (protéines motrices associées aux MTs) impliqué dans le transport antérograde et enrichi dans l'axone des neurones (Kondo *et al.*, 1994; Hirokawa, 1998, 2000).

Même si leur construction de tau contenait la séquence *cis* de ciblage axonal, Aronov *et al.* (2001) ont toutefois réalisé leur étude à l'aide d'une lignée cellulaire stable qui ne surexprimait pas la protéine tau. Le fait que le niveau d'expression de leur construction était effectivement similaire à celui de la protéine tau endogène leur suggérait que les deux protéines étaient régulées d'une manière semblable. Cette étude rappelle donc l'importance d'utiliser des niveaux physiologiques de tau exogène.

### 4.4. CONSÉQUENCE DE LA SUREXPRESSON DE TAU

#### 4.4.1. Perte de MAP2 dans le neurone

Dans nos cultures, une quantité importante de neurones transfectés avec GFP-Tau4R démontraient une perte évidente de la protéine MAP2, normalement présente dans le corps cellulaire et les dendrites (Figure 15, p. 74). Ce résultat représente donc un autre indice que la protéine tau exogène était exprimée trop fortement, puisqu'elle induisait un

débalancement du ratio normal de tau et de MAP2. Ces deux MAPs exercent plusieurs fonctions similaires au sein du neurone et possèdent des domaines de liaison aux MTs très semblables (Lewis *et al.*, 1988). Comme la protéine tau était exprimée à des niveaux beaucoup plus élevés par rapport à MAP2 et qu'elle se retrouvait en aussi grande quantité dans tous les compartiments cellulaires, il est alors possible qu'elle ait délogé MAP2 de sa position habituelle en se liant aux MTs du compartiment somato-dendritique. MAP2 deviendrait alors cytosolique et pourrait ensuite être dégradée par les protéases, d'où la diminution de son niveau protéique dans le neurone. Des résultats obtenus dans le laboratoire ont d'ailleurs démontré qu'une part importante de GFP-Tau4R est effectivement liée aux MTs des trois compartiments neuronaux. De plus, une étude *in vitro* a montré que l'incubation de protéines tau avec des MTs polymérisés par MAP2 mène à l'incorporation de tau dans les MTs et à une perte significative de MAP2 (Sandoval and Vandekerckhove, 1981). Tau déloge donc MAP2 des MTs déjà formés. Le contraire est également observé, ce qui indique que *in vitro* la présence d'une MAP peut interférer dans la liaison d'une autre avec les MTs. On a aussi démontré que la protéine tau hyperphosphorylée rencontrée dans les tauopathies pouvait séquestrer la protéine tau normale, MAP1 et MAP2 et ainsi causer leur détachement des MTs (Alonso *et al.*, 1996; Iqbal *et al.*, 1998). Peut-être que la protéine tau exogène normale en très grande quantité exerce également une action similaire sur les MAPs.

Les diverses MAPs occupent normalement des positions distinctes au sein du neurone. MAP2 se retrouve au niveau du corps cellulaire et des dendrites (Caceres *et al.*, 1984a; Caceres *et al.*, 1986). Tau et MAP1B sont enrichies dans l'axone, principalement au niveau de l'extrémité distale (Black *et al.*, 1994; Black *et al.*, 1996), mais montrent cependant un gradient de phosphorylation opposé dans les axones en croissance (Boyne *et al.*, 1995; Mandell and Banker, 1996a). Bien qu'une certaine compensation fonctionnelle puisse exister entre les différentes MAPs (Harada *et al.*, 1994; DiTella *et al.*, 1996; Takei *et al.*, 2000), leur distribution et leur phosphorylation distinctes dénotent fort probablement une action coordonnée et complémentaire entre elles. Ainsi, la perturbation de cette distribution normale de tau et de l'équilibre entre celle-ci et MAP2 par suite de la surexpression de tau, peut certainement affecter leur fonction respective et causer une perte de MAP2. Comme la surexpression de la protéine tau normale dans les modèles animaux conduit à l'apparition de caractéristiques typiques des tauopathies (voir Tableau II, p. 27),



la perte de MAP2 pourrait donc représenter une manifestation pathologique de l'accumulation de tau dans le modèle cellulaire employé.

#### **4.5. VALIDITÉ DU MODÈLE CELLULAIRE EN CONDITIONS NORMALES**

##### **4.5.1. Distribution de la protéine tau endogène totale : enrichissement dans l'axone**

Une des causes possibles de la distribution uniforme de tau exogène dans tous les compartiments neuronaux aurait pu provenir du système cellulaire utilisé si la protéine tau endogène elle-même n'avait pas été enrichie dans l'axone. La caractérisation de sa localisation dans ce modèle de cultures avait cependant permis d'écarter cette possibilité.

Le système cellulaire qui a été employé pour réaliser notre étude consistait en des cultures primaires de neurones de l'hippocampe de rats dans du milieu Neurobasal en présence du supplément B27. Ce même système de culture a également été utilisé par d'autres équipes (Duchaine *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004), mais ces études ne traitaient pas de tau comme sujet principal et sa caractérisation au sein de ce système n'avait, à notre connaissance, jamais été établie. En général, les études sur tau qui emploient ce type de neurones les utilisent en co-culture avec des cellules gliales et dans un milieu (MEM) contenant le supplément N2 (Goslin *et al.*, 1998). Bien qu'il s'agisse du même type cellulaire, nous avons observé certaines différences entre ces deux systèmes de culture suite à différents marquages immunocytochimiques de tau.

L'anticorps PolyTau, qui reconnaît l'ensemble des protéines tau indépendamment de leur état de phosphorylation, a été utilisé pour établir le patron de distribution de tau au cours du développement des neurones en culture dans nos conditions (Figure 12, p. 65). La distribution de MAP2 a aussi été définie en parallèle. Au début du développement (jour 1), tau et MAP2 se retrouvaient dans tous les compartiments neuronaux, bien qu'un gradient proximo-distal de tau dans l'axone était visible. À partir du jour 4, tau commençait à devenir principalement axonale, alors que MAP2 était déjà polarisée dans le compartiment somato-dendritique. Au jour 7, on distinguait clairement une prédominance de tau dans l'axone, principalement à son extrémité distale. D'autres études ont également démontré cet enrichissement axonal de tau avec des anticorps polyclonaux dans des neurones du

cervelet de rats *in vivo* (Brion *et al.*, 1988) et *in vitro* (Kosik and Finch, 1987), signe de la validité de notre système cellulaire.

Dans le système de culture de neurones de l'hippocampe habituellement utilisé (co-cultures avec les cellules gliales), la distribution des MAPs au cours du développement est très bien documentée. Le marquage de ces neurones avec un anticorps polyclonal contre tau indépendant de la phosphorylation (7A5) et un autre contre MAP2 montre également la présence de ces deux MAPs dans le corps cellulaire et tous les prolongements neuronaux au cours des stades 1 à 3 du développement (jour 0,25 à 1,5, voir Figure 1, p. 6) (Mandell and Banker, 1995, 1996a). MAP2 commence à disparaître de la partie distale de l'axone à partir du stade 3 et est exprimée uniquement dans le compartiment somato-dendritique au stade 4 (jour 4), comme dans notre système et comme c'est le cas *in situ* (Dotti *et al.*, 1987). Le gradient proximo-distal de tau dans l'axone est également présent, mais la protéine ne commence pas à disparaître du corps cellulaire et des dendrites, contrairement à ce que nous avons observé dans notre système au même moment (jour 4). Ces auteurs affirment néanmoins que tau devient polarisée dans l'axone après 7 à 10 jours, ce qu'il observent par contre uniquement dans des neurones extraits à l'aide d'un détergent qui élimine toutes les protéines cytosoliques et permet de visualiser les protéines tau attachées aux MTs seulement. Dans des neurones non extraits cependant, ils notent que l'immunoréactivité contre tau demeure présente dans le corps cellulaire (Mandell and Banker, 1995), alors que nous avons clairement observé l'enrichissement axonal de tau dans nos neurones non extraits. Ainsi, peu importe le système de culture utilisé (N2 ou B27), la distribution de ces deux MAPs est identique au cours des premiers stades de développement et la compartimentation de MAP2 a lieu au même moment, alors que celle de tau ne se déroule pas selon la même séquence. Le B27 contient probablement un ou des constituants, absents dans le N2, qui influencent la polarisation de tau. Ceux-ci ne peuvent toutefois être identifiés puisque la composition du B27 n'est pas dévoilée par le fabricant.

#### **4.5.2. Distribution de la protéine tau endogène déphosphorylée : enrichissement dans l'axone**

La plupart des études sur la distribution de tau dans les neurones *in vivo* et *in vitro* ont été faites avec l'anticorps Tau-1. À l'époque, on ignorait qu'il reconnaissait un épitope

déphosphorylé de tau (Ser<sup>195, 198, 199 et 202</sup>) (Szendrei *et al.*, 1993). Ainsi, le marquage des neurones de l'hippocampe avec cet anticorps a démontré que tau était concentrée dans les axones dans des coupes de cerveau du rat adulte, alors que dans ces mêmes neurones en co-culture avec les cellules gliales, elle était présente dans tous les compartiments neuronaux (Dotti *et al.*, 1987). Cette distribution uniforme de tau a d'ailleurs été observée à tous les stades du développement, même après 24 jours en culture, que les protéines tau solubles aient été extraites ou non. Ces auteurs ont alors conclu que tau demeurerait non polarisée à tous les stades de développement dans ce système de culture. Mandell et Banker (1995) ont toutefois rectifié la conclusion de cette étude, qui avait d'ailleurs été produite par ce même laboratoire, en affirmant que tau devient polarisée dans l'axone après 7 à 10 jours en culture dans des neurones extraits. Ils attribuaient cette différence de résultats à la méthode de détection utilisée auparavant, qui offrait une moins bonne résolution, ainsi qu'à la durée de fixation des neurones qui n'était alors pas assez longue. Ils ont en effet démontré que les neurones fixés pendant 45 minutes présentaient un marquage de Tau-1 plus intense dans l'axone au stade 3 de leur développement, alors que ceux fixés moins de dix minutes ne préservaient pas cette distribution de tau déphosphorylée. Le marquage de Tau-1 devenait alors très évident dans le compartiment somato-dendritique et reflétait tout à fait celui qu'ils obtenaient avec l'anticorps 7A5 (tau totale) (Mandell and Banker, 1996a).

Nous utilisons également ce type de culture auparavant et comme Dotti *et al.* (1987), nous observions la persistance de cette distribution uniforme de tau même au-delà de 15 jours de culture, autant avec l'anticorps Tau-1 que PolyTau et même après avoir fixé les neurones pendant 45 minutes (résultats non montrés). C'est d'ailleurs pour cette raison que nous cultivons désormais les neurones de l'hippocampe en présence du supplément B27, où un enrichissement de tau dans le compartiment axonal est alors évident, même dans les neurones non extraits. Le présent système nous semblait donc plus adéquat, du moins pour la réalisation de notre étude, puisqu'il reflète bien la distribution axonale normale de la protéine tau déphosphorylée à l'épitope de Tau-1 dans le cerveau de rats *in situ* (Binder *et al.*, 1985; Dotti *et al.*, 1987; Papasozomenos and Binder, 1987). En effet, nous observions aussi un enrichissement de la protéine tau dans l'axone avec l'anticorps Tau-1 à partir du jour 5 en culture, alors qu'elle se retrouvait dans tous les compartiments avant ce moment (Figure 13, p. 68). La présence du gradient proximo-distal était

néanmoins visible à tous les stades de développement. Cette prédominance de tau déphosphorylée dans le compartiment axonal a également été observée dans des cultures primaires de neurones matures de la moelle épinière (Kanai and Hirokawa, 1995; Hirokawa *et al.*, 1996), ainsi que dans d'autres études utilisant le même système cellulaire que nous (Duchaine *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004). De plus, les résultats de Jones *et al.* (2004) montrent aussi la présence du gradient proximo-distal de tau dans l'axone et la restriction de MAP2 dans le compartiment somato-dendritique entre 4,5 et 7 jours en culture, tout comme nous l'avons observé dans la présente étude.

Les résultats du marquage avec Tau-1 que nous avons obtenus démontrent que la population de protéines tau déphosphorylées à cet épitope semble principalement localisée dans l'extrémité distale de l'axone dans les neurones matures, indiquant ainsi que l'état de phosphorylation de tau serait impliqué dans le ciblage de cette protéine dans les neurones. D'ailleurs, plusieurs études ont montré la présence de protéines tau phosphorylées à cet épitope dans le compartiment somato-dendritique et l'axone, par suite d'un traitement à la phosphatase des neurones du SNC *in vivo* (Papasozomenos and Binder, 1987) et *in vitro* (Kanai and Hirokawa, 1995; Mandell and Banker, 1996a). Comme Mandell et Banker (1996a), nous avons ainsi conclu que la protéine tau est relativement plus déphosphorylée à l'épitope de Tau-1 dans l'axone que dans le compartiment somato-dendritique et que cette déphosphorylation augmente progressivement vers l'extrémité distale de l'axone.

#### **4.5.3. Distribution de la protéine tau endogène phosphorylée : quasi uniforme dans tous les compartiments neuronaux**

Beaucoup d'anticorps phospho-dépendants ont d'abord été produits dans le but d'identifier les protéines tau hyperphosphorylées contenues dans les PHFs. Cependant, certains d'entre eux ont également démontré la présence de protéines tau phosphorylées dans des cerveaux normaux. C'est le cas notamment de PHF-1 et de CP13, avec lesquels on a observé une population assez abondante de protéines tau phosphorylées aux épitopes de ces anticorps (Ser<sup>396</sup>/Ser<sup>404</sup> et Ser<sup>202</sup> respectivement) dans des homogénats d'hippocampes de cerveaux fœtaux et adultes chez l'humain, la souris et le rat (Jicha *et al.*, 1999). Il en est de même pour l'anticorps AT8 (Ser<sup>202</sup> et Thr<sup>205</sup> phosphorylées), dont la réactivité est observée dans les PHFs et le cerveau normal fœtal et adulte de l'humain et du

rat (Hasegawa *et al.*, 1996). Les résidus Ser<sup>202</sup>, Ser<sup>396</sup> et Ser<sup>404</sup> ont d'ailleurs été directement identifiés *in vivo* par spectrométrie de masse comme étant des sites phosphorylés dans le cerveau fœtal et adulte de rats (Hanger *et al.*, 1998).

Dans les neurones de l'hippocampe en culture, nous avons également observé la présence de protéines tau endogènes phosphorylées à ces épitopes (AT8, PHF-1 et CP13). La distribution de celles-ci était d'ailleurs similaire avec les trois anticorps phospho-dépendants utilisés, c'est-à-dire dans le corps cellulaire, les dendrites et l'axone. Avec le marquage de AT8, nous avons constaté que cette distribution persistait peu importe le stade de développement des neurones (Figure 14, p. 70). Des gradients proximo-distaux étaient tout de même observés dans les axones, bien qu'ils semblaient moins constants et parfois moins prononcés que ceux observés avec PolyTau et Tau-1. Mandell et Banker (1996a) ont également noté une augmentation proximo-distale de la phosphorylation de tau à l'épitope de PHF-1 et un marquage du compartiment somato-dendritique plus intense que celui obtenu avec Tau-1 dans certains neurones de l'hippocampe en co-culture avec les gliales (dans le N2). Comme nous l'avons aussi constaté, l'intensité de leur gradient axonal était cependant moins prononcée que celle du gradient de Tau-1. Il semble donc possible que des gradients de phosphorylation opposés de tau puissent exister simultanément à différents sites dans l'axone. Ce phénomène a également été observé dans le cas de MAP1B (Ulloa *et al.*, 1994). Selon Mandell et Banker (1996a), ceci suggère la possibilité qu'une régulation indépendante des différents sites de phosphorylation des MAPs puisse exister dans les neurones.

À notre connaissance, la seule étude immunohistochimique ayant utilisé l'anticorps AT8 pour déterminer la distribution normale de tau phosphorylée *in vivo* a été réalisée dans les neurones du cervelet de chat (Riederer *et al.*, 2001). Cette étude a révélé un marquage important dans le cerveau en développement, marquage qui se retrouvait autant dans les dendrites que dans l'axone, comme c'était le cas dans nos cultures de neurones de l'hippocampe. Chez des chatons de un mois cependant, la phosphorylation de tau à cet épitope disparaissait de l'axone, alors qu'elle était toujours présente dans les neurones en culture, même au-delà de 7 jours. Ceci nous indique que la maturation des neurones en culture n'atteint peut-être pas tout à fait le même niveau que celle des neurones *in vivo*, ce qui est tout à fait probable vu l'absence de contact avec tous les autres constituants du

cerveau. Par exemple, l'absence de molécules de la matrice extracellulaire, de molécules d'adhésion cellulaire, de facteurs trophiques et de neurotransmetteurs dans l'environnement des neurones en culture influence certainement leur maturation (Mattson, 1999). Il est également possible que certaines différences existent entre les neurones du cervelet et ceux de l'hippocampe quant à la distribution des diverses populations de tau. Néanmoins, les résultats de marquages de ces deux études permettent de tirer une conclusion analogue, soit que le compartiment somato-dendritique est la région présentant une prédominance de protéines tau phosphorylées, le marquage avec Tau-1 (tau déphosphorylée) étant axonal dans les deux cas (Riederer *et al.*, 2001). D'ailleurs, un marquage de tau avec cet anticorps apparaît dans le compartiment somato-dendritique par suite d'une déphosphorylation des protéines neuronales (Papasozomenos and Binder, 1987; Kanai and Hirokawa, 1995; Mandell and Banker, 1996a). Ceci révèle donc la présence d'une population phosphorylée de tau à l'épitope de Tau-1 dans le compartiment somato-dendritique, confirmant également la conclusion émise.

En résumé, dans les neurones de l'hippocampe cultivés en présence du supplément B27, la majorité des protéines tau endogènes était localisée dans l'axone, tel que démontré par le marquage de PolyTau. Cependant, on en retrouvait également dans les autres compartiments et leur distribution différait selon leur état de phosphorylation. Ainsi, elles étaient relativement plus déphosphorylées à l'épitope de Tau-1 dans l'axone, alors que le compartiment somato-dendritique renfermait surtout des formes phosphorylées.

## **4.6. DIFFÉRENTES POPULATIONS DE TAU PHOSPHORYLÉE**

### **4.6.1. Population de tau normale**

Le fait que les protéines tau endogènes étaient distribuées différemment selon leur état de phosphorylation nous indiquait la présence de différentes populations de tau à certains endroits dans les neurones. Cependant, les résultats obtenus à partir de marquages immunocytochimiques à l'aide d'anticorps phospho-dépendants sont basés sur des observations purement qualitatives et ne renseignent aucunement sur la nature des protéines tau marquées (isoformes), ni sur la localisation subcellulaire exacte de celles-ci à l'intérieur d'un compartiment neuronal. Il existe néanmoins des différences entre les populations de tau marquées avec l'un ou l'autre des anticorps phospho-dépendants. Par

exemple, la population de tau déphosphorylée à l'épitope de Tau-1 s'est retrouvée dans une fraction riche en membranes plasmiques, par suite d'un fractionnement cellulaire à partir de neurones NT2-N (tau endogène) et de cellules PC12 transfectées avec tau, alors que toutes les phospho-isoformes de tau, révélées par les anticorps PHF-1, AT8 et AT180 (qui reconnaît la Thr<sup>231</sup> phosphorylée), étaient absentes de cette fraction (Maas *et al.*, 2000). De plus, des résultats obtenus dans notre laboratoire à partir du fractionnement subcellulaire de cerveaux de rats adultes normaux ont montré que certaines populations de tau phosphorylées étaient associées à différents compartiments golgiens. Les protéines tau phosphorylées à l'épitope de AT8 se retrouvaient principalement dans une fraction enrichie en membranes golgiennes du compartiment *cis*, alors que celles phosphorylées à l'épitope de PHF-1 étaient surtout présentes dans la fraction riche en réseaux *trans*-golgiens (TGN) et en membranes golgiennes du compartiment *médial*.

Une étude a également démontré que les épitopes phosphorylés reconnus par les anticorps AT8 et PHF-1 étaient présents dans différentes isoformes de tau bovines et humaines (Hernandez *et al.*, 2003). AT8 marquait surtout les isoformes de tau ayant une plus grande mobilité électrophorétique sur gel, alors que PHF-1 reconnaissait les isoformes de haut poids moléculaire, avec une vitesse de migration plus lente. Un autre patron de bandes a également été observé avec l'anticorps AT180. Toutefois, ces différences étaient perdues dans le cas des protéines tau des PHFs de patients atteints d'Alzheimer, où les anticorps révélaient alors les mêmes bandes sur gel. Ces auteurs ont suggéré que les différences de phosphorylation des diverses isoformes de tau pouvaient être dues à une distribution subcellulaire différente de ces isoformes au sein du neurone. Ils appuient donc l'idée que les anticorps phospho-dépendants n'identifient pas nécessairement les mêmes populations de tau, comme nos résultats du fractionnement tendent à le démontrer, et que la distribution cellulaire et subcellulaire de tau semble reliée à la phosphorylation.

#### **4.6.2. Population de tau pathologique**

Il existe également une hétérogénéité dans la phosphorylation de tau contenue dans les PHFs. Lee *et al.* (2004) ont effectivement constaté que les protéines tau phosphorylées au site Tyr<sup>18</sup> n'étaient pas contenues dans tous les PHFs et qu'elles étaient absentes de certaines régions des neurones qui présentaient des PHFs marqués avec l'anticorps AT8.

Certains PHFs contiennent donc des protéines tau phosphorylées à certains sites et non phosphorylées à d'autres, et ceux-ci ne sont pas nécessairement les mêmes dans tous les PHFs. Dans des souris transgéniques qui exprimaient exclusivement les isoformes humaines normales de tau et qui développaient une tauopathie avec l'âge, des différences ont également été observées entre les patrons de phosphorylation (Andorfer *et al.*, 2003). Alors qu'une augmentation de la phosphorylation apparaissait avec l'âge à certains sites de tau, dont celui de CP13, aucune différence significative n'était décelée dans le cas de PHF-1. Ces résultats supportent également l'idée que différentes populations de tau phosphorylées sont identifiées par les divers anticorps phospho-dépendants et ce, autant en conditions normales que dans un contexte pathologique.

#### **4.7. VALIDITÉ DU MODÈLE CELLULAIRE EN CONDITIONS DE SUREXPRESSION DE LA PROTÉINE TAU NORMALE**

##### **4.7.1. Accumulation des protéines tau phosphorylées dans le compartiment somato-dendritique**

Braak *et al.* (1994) ont mis en évidence une séquence de changements neurofibrillaires qui mène à la formation de NFTs dans les neurones du cerveau humain. Un marquage avec l'anticorps AT8 est d'abord détecté dans les neurones pyramidaux, avant même la présence de changements neurofibrillaires. Ensuite, l'apparition de matériel granulaire immunoréactif pour AT8 dans tous les compartiments neuronaux est l'un des premiers changements observés. À un stade plus avancé, une perte du marquage de AT8 à partir de la partie intermédiaire des dendrites est observée, mais le corps cellulaire demeure marqué de façon homogène et montre la présence de NFTs. Les résultats de Braak *et al.* (1994) suggèrent donc que l'altération de la protéine tau au site de AT8 représente un changement précoce qui mène éventuellement à la formation de NFTs. Même si le marquage avec AT8 n'était pas granulaire dans nos neurones en culture, nous avons également observé une redistribution des protéines tau phosphorylées à cet épitope, suite à la surexpression de la protéine tau exogène normale. En effet, le marquage de AT8 était alors confiné au niveau du corps cellulaire et dans le début des prolongements (Figure 17, 24h, p. 80), contrairement à une distribution plutôt uniforme en conditions normales (Figure 14, p. 70). Autrement dit, la population de tau endogène marquée avec AT8 était



distribuée dans tous les compartiments neuronaux en conditions normales, alors qu'en condition de surexpression de tau, les protéines tau endogènes et exogènes phosphorylées à cet épitope étaient restreintes au compartiment somato-dendritique. D'ailleurs, cette redistribution se produisait bien qu'une portion importante de tau exogène (non phosphorylée à cet épitope) demeurait présente dans l'axone (Figure 17, 24h, p. 80). Une distribution différente de la protéine tau déphosphorylée à l'épitope de Tau-1 a également été observée suite à la surexpression de tau : le marquage apparaissait alors également dans le compartiment somato-dendritique (Figure 16, p. 77) plutôt que de demeurer concentré au niveau de l'axone, comme c'était le cas en conditions normales (Figure 13, p. 68). Ces résultats semblent donc le reflet d'un déséquilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation de tau dans des conditions de surexpression, phénomène d'ailleurs rencontré au cours des tauopathies.

Dans un modèle de tauopathie où les souris transgéniques exprimaient exclusivement les isoformes humaines normales de tau, une redistribution de tau phosphorylée à l'épitope Ser<sup>202</sup> (CP13) des axones vers les corps cellulaires a également été observée (Andorfer *et al.*, 2003). Plusieurs autres modèles de tauopathies humaines ont aussi été produits en surexprimant seulement une isoforme normale de tau chez la souris (voir Tableau II, p. 27). Il en est de même chez la lamproie, qui démontrait alors des dépôts de protéines tau hyperphosphorylées à plusieurs épitopes, dont celui de AT8, dans le compartiment somato-dendritique (Hall *et al.*, 2001). Ainsi, la surexpression de la protéine tau normale dans le système cellulaire utilisé au cours de la présente étude pourrait constituer un bon modèle pour étudier le dysfonctionnement de tau en conditions pathologiques. Une équipe ayant surexprimé des isoformes humaines de tau dans une lignée cellulaire de neuroblastomes humains (SY5Y) a d'ailleurs noté une augmentation de la phosphorylation de tau et, dans certains cas, un plus grand risque de mort cellulaire apoptotique (Delobel *et al.*, 2003), démontrant ainsi que l'utilisation d'un modèle cellulaire surexprimant la protéine tau normale peut reproduire certaines conditions pathologiques des tauopathies. Notre modèle s'avère d'autant plus approprié qu'il s'agit de neurones de l'hippocampe, donc de cellules où la protéine tau est normalement exprimée et qui constituent des cibles réelles dans l'Alzheimer et dans d'autres tauopathies. Il sera par ailleurs très intéressant de vérifier dans ce système cellulaire les effets de l'expression des mutants de tau qui miment l'hyperphosphorylation, d'autant plus qu'un autre groupe a

montré un gain de fonctions neurotoxiques sans agrégats de tau dans des cellules neuronales NT2-N surexprimant des mutants similaires (Fath *et al.*, 2002).

#### 4.8. CONCLUSION

L'objectif de départ était de vérifier si l'hyperphosphorylation de tau dans les tauopathies est responsable de son accumulation dans le compartiment somato-dendritique des neurones. Bien que nous n'ayons pas pu répondre à cette question, l'étude nous a malgré tout permis de renforcer la plausibilité de l'hypothèse en démontrant que la distribution des protéines tau dans les neurones diffère selon leur état de phosphorylation. Le compartiment somato-dendritique renferme principalement des formes phosphorylées, les protéines tau endogènes déphosphorylées étant surtout présentes dans l'axone. De plus, une redistribution se produit suite à la surexpression de la protéine tau exogène normale. Les populations de tau endogène et exogène phosphorylées se retrouvent alors confinées exclusivement au niveau du compartiment somato-dendritique, alors que l'axone contient normalement une certaine quantité de protéines tau phosphorylées. La caractérisation de la distribution de la protéine tau a également permis de confirmer la validité du système cellulaire utilisé. En effet, ce système reflète bien l'enrichissement axonal normal de la protéine et en conditions de surexpression de tau, il constitue un modèle apparemment adéquat et simple pour étudier les changements pathologiques impliqués dans les tauopathies. Il reste maintenant à répondre clairement à l'objectif, en répétant l'étude avec des niveaux d'expression physiologiques des mutants de pseudohyperphosphorylation de tau, auxquels aura été ajoutée la région 3'UTR contenant le signal de ciblage axonal. Enfin, nous possédons désormais tous les outils nécessaires pour déterminer l'effet de l'hyperphosphorylation de tau sur sa localisation somato-dendritique dans les tauopathies. L'atteinte de cet objectif pourrait avoir un impact important sur la voie de recherche à privilégier comme approche thérapeutique pour traiter les tauopathies telles que l'Alzheimer.

## 5. LISTE DE RÉFÉRENCES

- Aamodt, E.J., and Williams, R.C., Jr. (1984) Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro. *Biochemistry* **23**: 6023-6031.
- Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T.C., Cryns, V., Berry, R.W., Kuret, J., and Binder, L.I. (2000) C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* **113 Pt 21**: 3737-3745.
- Al-Bassam, J., Ozer, R.S., Safer, D., Halpain, S., and Milligan, R.A. (2002) MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol* **157**: 1187-1196.
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M.J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P.C., Atzori, C., Migheli, A., Crowther, R.A., Ghetti, B., Spillantini, M.G., and Goedert, M. (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* **22**: 9340-9351.
- 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., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6923-6928.
- Amano, M., Kaneko, T., Maeda, A., Nakayama, M., Ito, M., Yamauchi, T., Goto, H., Fukata, Y., Oshiro, N., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (2003) Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *J Neurochem* **87**: 780-790.
- Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., de Silva, R., Tucker, K.L., Barde, Y.A., Duff, K., and Davies, P. (2003) Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem* **86**: 582-590.
- Andreadis, A., Brown, W.M., and Kosik, K.S. (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* **31**: 10626-10633.
- Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., and Ginzburg, I. (2001) Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci* **21**: 6577-6587.
- Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., and Ginzburg, I. (2002) Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci* **115**: 3817-3827.

- Arrasate, M., Perez, M., and Avila, J. (2000) Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res* **25**: 43-50.
- Auld, D.S., and Robitaille, R. (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* **40**: 389-400.
- 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.
- Baas, P.W. (1999) Microtubules and neuronal polarity: lessons from mitosis. *Neuron* **22**: 23-31.
- Baas, P.W., Deitch, J.S., Black, M.M., and Banker, G.A. (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8335-8339.
- Baas, P.W., Black, M.M., and Banker, G.A. (1989) Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* **109**: 3085-3094.
- Bamburg, J.R., and Bernstein, B.W. (1991) Actin and actin-binding proteins in neurons. In: *The neuronal cytoskeleton*, ed R.D. Burgoyne. Wiley-Liss, New York, 121-160.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Wisniewski, H.M. (1989) Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* **477**: 90-99.
- Banker, G.A., and Cowan, W.M. (1979) Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J Comp Neurol* **187**: 469-493.
- Bartlett, W.P., and Banker, G.A. (1984a) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* **4**: 1944-1953.
- Bartlett, W.P., and Banker, G.A. (1984b) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci* **4**: 1954-1965.
- Baumann, K., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Pivnicka-Worms, H., and Mandelkow, E. (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* **336**: 417-424.
- Biernat, J., and Mandelkow, E.M. (1999) The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell* **10**: 727-740.

- Biernat, J., Mandelkow, E.M., Schroter, C., Lichtenberg-Kraag, B., Steiner, B., Berling, B., Meyer, H., Mercken, M., Vandermeeren, A., Goedert, M., and et al. (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *Embo J* **11**: 1593-1597.
- 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.
- Billingsley, M.L., and Kincaid, R.L. (1997) Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* **323** ( Pt 3): 577-591.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., Kim, H., Caceres, A., Payne, M.R., and Rebhun, L.I. (1984) Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 5613-5617.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* **101**: 1371-1378.
- Black, M.M., Slaughter, T., and Fischer, I. (1994) Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *J Neurosci* **14**: 857-870.
- Black, M.M., Slaughter, T., Moshiach, 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., Schoenfeld, T.A., and Vallee, R.B. (1984) Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP 1 (microtubule-associated protein 1) in the nervous system. *J Cell Biol* **98**: 320-330.
- Bottenstein, J.E., and Sato, G.H. (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 514-517.
- Boyne, L.J., Martin, K., Hockfield, S., and Fischer, I. (1995) Expression and distribution of phosphorylated MAP1B in growing axons of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **40**: 439-450.
- 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 (Berl)* **87**: 554-567.
- Bradke, F., and Dotti, C.G. (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science* **283**: 1931-1934.

- Bradke, F., and Dotti, C.G. (2000) Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol* **10**: 574-581.
- Brady, R.M., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1995) Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging* **16**: 479-486.
- Bramblett, G.T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1992) Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent tau and accumulation of abnormal tau-isoforms (A68 proteins). *Lab Invest* **66**: 212-222.
- Bramblett, G.T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S.E., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* **10**: 1089-1099.
- Brandt, R., and Lee, G. (1993) The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. *J Neurochem* **61**: 997-1005.
- Brandt, R., Lee, G., Teplow, D.B., Shalloway, D., and Abdel-Ghany, M. (1994) Differential effect of phosphorylation and substrate modulation on tau's ability to promote microtubule growth and nucleation. *J Biol Chem* **269**: 11776-11782.
- Brandt, R., Leger, 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.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., and Price, P.J. (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* **35**: 567-576.
- Brion, J.P., Guilleminot, J., Couchie, D., Flament-Durand, J., and Nunez, J. (1988) Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neuroscience* **25**: 139-146.
- Brion, J.P., Tremp, G., and Octave, J.N. (1999) Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **154**: 255-270.
- Brown, M.D., Banker, G.A., Hussaini, I.M., Gonias, S.L., and Vandenberg, S.R. (1997) Low density lipoprotein receptor-related protein is expressed early and becomes restricted to a somatodendritic domain during neuronal differentiation in culture. *Brain Res* **747**: 313-317.
- Brugg, B., Reddy, D., and Matus, A. (1993) Attenuation of microtubule-associated protein 1B expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits initiation of neurite outgrowth. *Neuroscience* **52**: 489-496.

- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **33**: 95-130.
- Caceres, A., and Kosik, K.S. (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* **343**: 461-463.
- Caceres, A., Banker, G., Steward, O., Binder, L., and Payne, M. (1984a) MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res* **315**: 314-318.
- Caceres, A., Binder, L.I., Payne, M.R., Bender, P., Rebhun, L., and Steward, O. (1984b) Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J Neurosci* **4**: 394-410.
- Caceres, A., Banker, G.A., and Binder, L. (1986) Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **6**: 714-722.
- Caceres, A., Potrebic, S., and Kosik, K.S. (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* **11**: 1515-1523.
- Caceres, A., Mautino, J., and Kosik, K.S. (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* **9**: 607-618.
- Cameron, P.L., Sudhof, T.C., Jahn, R., and De Camilli, P. (1991) Colocalization of synaptophysin with transferrin receptors: implications for synaptic vesicle biogenesis. *J Cell Biol* **115**: 151-164.
- Carrier, M.F., Simon, C., Cassoly, R., and Pradel, L.A. (1984) Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* **66**: 305-311.
- Carmel, G., Mager, E.M., Binder, L.I., and Kuret, J. (1996) The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* **271**: 32789-32795.
- 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.
- Cho, J.H., and Johnson, G.V. (2003) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* **278**: 187-193.
- Clark, L.N., Poorkaj, P., Wszolek, Z., Geschwind, D.H., Nasreddine, Z.S., Miller, B., Li, D., Payami, H., Awert, F., Markopoulou, K., Andreadis, A., D'Souza, I., Lee, V.M.,

- Reed, L., Trojanowski, J.Q., Zhukareva, V., Bird, T., Schellenberg, G., and Wilhelmsen, K.C. (1998) Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13103-13107.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* **116**: 207-225.
- Correas, I., Padilla, R., and Avila, J. (1990) The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J* **269**: 61-64.
- Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I.S., Liem, R.K., Shelanski, M.L., and Nunez, J. (1992) Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4378-4381.
- Davies, P. (2000) A very incomplete comprehensive theory of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **924**: 8-16.
- De Camilli, P., Moretti, M., Donini, S.D., Walter, U., and Lohmann, S.M. (1986) Heterogeneous distribution of the cAMP receptor protein RII in the nervous system: evidence for its intracellular accumulation on microtubules, microtubule-organizing centers, and in the area of the Golgi complex. *J Cell Biol* **103**: 189-203.
- de Hoop, M., von Poser, C., Lange, C., Ikonen, E., Hunziker, W., and Dotti, C.G. (1995) Intracellular routing of wild-type and mutated polymeric immunoglobulin receptor in hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* **130**: 1447-1459.
- de Waegh, S.M., Lee, V.M., and Brady, S.T. (1992) Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* **68**: 451-463.
- Delobel, P., Mailliot, C., Hamdane, M., Sambo, A.V., Begard, S., Violleau, A., Delacourte, A., and Buee, L. (2003) Stable-tau overexpression in human neuroblastoma cells: an open door for explaining neuronal death in tauopathies. *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 623-634.
- Dinsmore, J.H., and Solomon, F. (1991) Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* **64**: 817-826.
- DiTella, M.C., Feiguin, F., Carri, N., Kosik, K.S., and Caceres, A. (1996) MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* **109** ( Pt 2): 467-477.



- Doll, T., Meichsner, M., Riederer, B.M., Honegger, P., and Matus, A. (1993) An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J Cell Sci* **106** ( Pt 2): 633-639.
- Dotti, C.G., and Banker, G.A. (1987) Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* **330**: 254-256.
- Dotti, C.G., Banker, G.A., and Binder, L.I. (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* **23**: 121-130.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **8**: 1454-1468.
- 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.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* **89**: 297-308.
- Drewes, G., Ebner, A., and Mandelkow, E.M. (1998) MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* **23**: 307-311.
- Drubin, D.G., and Kirschner, M.W. (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* **103**: 2739-2746.
- Duchaine, T.F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M.A., and DesGroseillers, L. (2002) Stauf2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* **115**: 3285-3295.
- Duff, K., Knight, H., Refolo, L.M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., Malester, B., Hutton, M., Adamson, J., Goedert, M., Burki, K., and Davies, P. (2000) Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* **7**: 87-98.
- Ebner, 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.
- Eidenmuller, J., Fath, T., Hellwig, A., Reed, J., Sontag, E., and Brandt, R. (2000) Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: information from phosphorylation-mimicking mutated tau proteins. *Biochemistry* **39**: 13166-13175.

- Eidenmuller, J., Fath, T., Maas, T., Pool, M., Sontag, E., and Brandt, R. (2001) Phosphorylation-mimicking glutamate clusters in the proline-rich region are sufficient to simulate the functional deficiencies of hyperphosphorylated tau protein. *Biochem J* **357**: 759-767.
- Fath, T., Eidenmuller, J., and Brandt, R. (2002) Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **22**: 9733-9741.
- Ferhat, L., Bernard, A., Ribas de Pouplana, L., Ben-Ari, Y., and Khrestchatisky, M. (1994) Structure, regional and developmental expression of rat MAP2d, a MAP2 splice variant encoding four microtubule-binding domains. *Neurochem Int* **25**: 327-338.
- Fletcher, T.L., Cameron, P., De Camilli, P., and Banker, G. (1991) The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci* **11**: 1617-1626.
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000) Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta* **1502**: 122-132.
- Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Menager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., and Kaibuchi, K. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* **4**: 583-591.
- Garner, C.C., and Matus, A. (1988) Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *J Cell Biol* **106**: 779-783.
- Garner, C.C., Garner, A., Huber, G., Kozak, C., and Matus, A. (1990) Molecular cloning of microtubule-associated protein 1 (MAP1A) and microtubule-associated protein 5 (MAP1B): identification of distinct genes and their differential expression in developing brain. *J Neurochem* **55**: 146-154.
- Giuditta, A., Kaplan, B.B., van Minnen, J., Alvarez, J., and Koenig, E. (2002) Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci* **25**: 400-404.
- Goedert, M. (2004) Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* **15**: 45-49.
- 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., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., and Klug, A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4051-4055.

- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **3**: 519-526.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., and Crowther, R.A. (1989b) 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., Crowther, R.A., and Garner, C.C. (1991) Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci* **14**: 193-199.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J., and Crowther, R.A. (1992a) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* **8**: 159-168.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., and Crowther, R.A. (1992b) Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1983-1987.
- Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R.A., Six, J., Lubke, U., Vandermeeren, M., Cras, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1993) The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5066-5070.
- Goedert, M., Jakes, R., and Vanmechelen, E. (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* **189**: 167-169.
- 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.
- Gonzalez-Billault, C., Avila, J., and Caceres, A. (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol Biol Cell* **12**: 2087-2098.
- Gonzalez-Billault, C., Owen, R., Gordon-Weeks, P.R., and Avila, J. (2002) Microtubule-associated protein 1B is involved in the initial stages of axonogenesis in peripheral nervous system cultured neurons. *Brain Res* **943**: 56-67.
- 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.
- Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., and Feinstein, S.C. (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* **8**: 353-365.

- Goslin, K., and Banker, G. (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* **108**: 1507-1516.
- Goslin, K., and Banker, G. (1990) Rapid changes in the distribution of GAP-43 correlate with the expression of neuronal polarity during normal development and under experimental conditions. *J Cell Biol* **110**: 1319-1331.
- Goslin, K., Schreyer, D.J., Skene, J.H., and Banker, G. (1988) Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature* **336**: 672-674.
- Goslin, K., Schreyer, D.J., Skene, J.H., and Banker, G. (1990) Changes in the distribution of GAP-43 during the development of neuronal polarity. *J Neurosci* **10**: 588-602.
- Goslin, K., Asmussen, H., and Banker, G. (1998) Rat hippocampal neurons in low-density culture. In : *Culturing nerve cells*, 2<sup>nd</sup> edition, ed G. Banker and K. Goslin. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 339-370.
- Gotz, J. (2001) Tau and transgenic animal models. *Brain Res Brain Res Rev* **35**: 266-286.
- Gotz, J., Probst, A., Spillantini, M.G., Schafer, T., Jakes, R., Burki, K., and Goedert, M. (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *Embo J* **14**: 1304-1313.
- Gotz, J., Chen, F., Barmettler, R., and Nitsch, R.M. (2001a) Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem* **276**: 529-534.
- Gotz, J., Tolnay, M., Barmettler, R., Chen, F., Probst, A., and Nitsch, R.M. (2001b) Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. *Eur J Neurosci* **13**: 2131-2140.
- Grant, P., and Pant, H.C. (2000) Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol* **29**: 843-872.
- Greenberg, S.G., Davies, P., Schein, J.D., and Binder, L.I. (1992) Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem* **267**: 564-569.
- 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.

- 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.
- Hagestedt, T., Lichtenberg, B., Wille, H., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1989) Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation: correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. *J Cell Biol* **109**: 1643-1651.
- Hall, G.F., Yao, J., and Lee, G. (1997) Human tau becomes phosphorylated and forms filamentous deposits when overexpressed in lamprey central neurons in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4733-4738.
- Hall, G.F., Chu, B., Lee, G., and Yao, J. (2000) Human tau filaments induce microtubule and synapse loss in an in vivo model of neurofibrillary degenerative disease. *J Cell Sci* **113 ( Pt 8)**: 1373-1387.
- Hall, G.F., Lee, V.M., Lee, G., and Yao, J. (2001) Staging of neurofibrillary degeneration caused by human tau overexpression in a unique cellular model of human tauopathy. *Am J Pathol* **158**: 235-246.
- Hall, G.F., Lee, S., and Yao, J. (2002) Neurofibrillary degeneration can be arrested in an in vivo cellular model of human tauopathy by application of a compound which inhibits tau filament formation in vitro. *J Mol Neurosci* **19**: 253-260.
- 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.
- 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.
- Harada, A., Teng, J., Takei, Y., Oguchi, K., and Hirokawa, N. (2002) MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* **158**: 541-549.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**: 353-356.
- 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., Jakes, R., Crowther, R.A., Lee, V.M., Ihara, Y., and Goedert, M. (1996) Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett* **384**: 25-30.

- Heidary, G., and Fortini, M.E. (2001) Identification and characterization of the *Drosophila* tau homolog. *Mech Dev* **108**: 171-178.
- Heimann, R., Shelanski, M.L., and Liem, R.K. (1985) Microtubule-associated proteins bind specifically to the 70-kDa neurofilament protein. *J Biol Chem* **260**: 12160-12166.
- Henriquez, J.P., Cross, D., Vial, C., and Maccioni, R.B. (1995) Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types. *Cell Biochem Funct* **13**: 239-250.
- Hernandez, F., Lucas, J.J., Cuadros, R., and Avila, J. (2003) GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiol Aging* **24**: 1087-1094.
- Higuchi, M., Ishihara, T., Zhang, B., Hong, M., Andreadis, A., Trojanowski, J., and Lee, V.M. (2002) Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration. *Neuron* **35**: 433-446.
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M.W., and Martin, D.W., Jr. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* **9**: 1381-1388.
- Hirokawa, N. (1991) Molecular architecture and dynamics of the neuronal cytoskeleton. In: *The neuronal cytoskeleton*, ed R.D. Burgoyne. Wiley-Liss, New York, 5-74.
- Hirokawa, N. (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 74-81.
- Hirokawa, N. (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**: 519-526.
- Hirokawa, N. (2000) Stirring up development with the heterotrimeric kinesin KIF3. *Traffic* **1**: 29-34.
- Hirokawa, N., Shiomura, Y., and Okabe, S. (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* **107**: 1449-1459.
- Hirokawa, N., Funakoshi, T., Sato-Harada, R., and Kanai, Y. (1996) Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol* **132**: 667-679.
- Hoffmann, R., Lee, V.M., Leight, S., Varga, I., and Otvos, L., Jr. (1997) Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry* **36**: 8114-8124.

- Hong, M., Chen, D.C., Klein, P.S., and Lee, V.M. (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* **272**: 25326-25332.
- Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J.C., Wilhelmsen, K.C., Schellenberg, G.D., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1998) Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* **282**: 1914-1917.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L., and Conlon, P.J. (1988) A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* **6**: 1204-1210.
- Horio, T., and Hotani, H. (1986) Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* **321**: 605-607.
- Horton, A.C., and Ehlers, M.D. (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* **40**: 277-295.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Heutink, P., and et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**: 702-705.
- Hwang, S.C., Jhon, D.Y., Bae, Y.S., Kim, J.H., and Rhee, S.G. (1996) Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* **271**: 18342-18349.
- Ikegami, S., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000) Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci Lett* **279**: 129-132.
- Iqbal, K., Alonso, A.C., Gong, C.X., Khatoon, S., Pei, J.J., Wang, J.Z., and Grundke-Iqbal, I. (1998) Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm Suppl* **53**: 169-180.
- 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.
- Ishihara, T., Zhang, B., Higuchi, M., Yoshiyama, Y., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2001) Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol* **158**: 555-562.

- Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D., and Dickson, D.W. (2003) Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**: 389-397.
- Jackson, G.R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T.K., Wagle, N., Brown, C.A., Massachi, S., and Geschwind, D.H. (2002) Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* **34**: 509-519.
- Jenkins, S.M., and Johnson, G.V. (1998) Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport* **9**: 67-71.
- Jenkins, S.M., and Johnson, G.V. (2000) Microtubule/MAP-affinity regulating kinase (MARK) is activated by phenylarsine oxide in situ and phosphorylates tau within its microtubule-binding domain. *J Neurochem* **74**: 1463-1468.
- Jicha, G.A., Lane, E., Vincent, I., Otvos, L., Jr., Hoffmann, R., and Davies, P. (1997) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **69**: 2087-2095.
- Jicha, G.A., Weaver, C., Lane, E., Vianna, C., Kress, Y., Rockwood, J., and Davies, P. (1999) cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **19**: 7486-7494.
- Johnson, G.V. (1992) Differential phosphorylation of tau by cyclic AMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. *J Neurochem* **59**: 2056-2062.
- Jones, S.B., Lu, H.Y., and Lu, Q. (2004) Abl tyrosine kinase promotes dendrogenesis by inducing actin cytoskeletal rearrangements in cooperation with rho family small GTPases in hippocampal neurons. *J Neurosci* **24**: 8510-8521.
- Kaech, S., Brinkhaus, H., and Matus, A. (1999) Volatile anesthetics block actin-based motility in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10433-10437.
- Kanai, Y., and Hirokawa, N. (1995) Sorting mechanisms of tau and MAP2 in neurons: suppressed axonal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding. *Neuron* **14**: 421-432.
- Kanai, Y., Takemura, R., Oshima, T., Mori, H., Ihara, Y., Yanagisawa, M., Masaki, T., and Hirokawa, N. (1989) Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J Cell Biol* **109**: 1173-1184.
- Kanai, Y., Chen, J., and Hirokawa, N. (1992) Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *Embo J* **11**: 3953-3961.



- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M. (2000) *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill Health Professions Division.
- Kanemaru, K., Takio, K., Miura, R., Titani, K., and Ihara, Y. (1992) Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem* **58**: 1667-1675.
- Kar, S., Fan, J., Smith, M.J., Goedert, M., and Amos, L.A. (2003) Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *Embo J* **22**: 70-77.
- 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.
- 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.
- Kobayashi, K., Nakano, H., Hayashi, M., Shimazaki, M., Fukutani, Y., Sasaki, K., Sugimori, K., and Koshino, Y. (2003) Association of phosphorylation site of tau protein with neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **208**: 17-24.
- Kobayashi, T., Storrie, B., Simons, K., and Dotti, C.G. (1992) A functional barrier to movement of lipids in polarized neurons. *Nature* **359**: 647-650.
- Koenig, E., and Giuditta, A. (1999) Protein-synthesizing machinery in the axon compartment. *Neuroscience* **89**: 5-15.
- Kondo, S., Sato-Yoshitake, R., Noda, Y., Aizawa, H., Nakata, T., Matsuura, Y., and Hirokawa, N. (1994) KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon. *J Cell Biol* **125**: 1095-1107.
- Kopke, 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., and Finch, E.A. (1987) MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J Neurosci* **7**: 3142-3153.

- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Binder, L., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., and Lee, G. (1988) Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron* **1**: 817-825.
- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., and Neve, R.L. (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* **2**: 1389-1397.
- Kowall, N.W., and Kosik, K.S. (1987) Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **22**: 639-643.
- Kowalski, R.J., and Williams, R.C., Jr. (1993) Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *J Biol Chem* **268**: 9847-9855.
- Kraemer, B.C., Zhang, B., Leverenz, J.B., Thomas, J.H., Trojanowski, J.Q., and Schellenberg, G.D. (2003) Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9980-9985.
- 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.
- Kuznetsov, S.A., Rodionov, V.I., Gelfand, V.I., and Rosenblat, V.A. (1981) Microtubule-associated protein MAP1 promotes microtubule assembly in vitro. *FEBS Lett* **135**: 241-244.
- Lang, E., Szendrei, G.I., Lee, V.M., and Otvos, L., Jr. (1992) Immunological and conformation characterization of a phosphorylated immunodominant epitope on the paired helical filaments found in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 783-790.
- LeClerc, N., Kosik, K.S., Cowan, N., Pienkowski, T.P., and Baas, P.W. (1993) Process formation in Sf9 cells induced by the expression of a microtubule-associated protein 2C-like construct. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6223-6227.
- Leclerc, N., Baas, P.W., Garner, C.C., and Kosik, K.S. (1996) Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct patterns of process outgrowth. *Mol Biol Cell* **7**: 443-455.
- Lee, G. (1990) Tau protein: an update on structure and function. *Cell Motil Cytoskeleton* **15**: 199-203.
- Lee, G., Neve, R.L., and Kosik, K.S. (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* **2**: 1615-1624.
- 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* **111** ( Pt 21): 3167-3177.

- Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V.M., Litersky, J.M., Bhaskar, K., Fang, S.M., Do, L.H., Andreadis, A., Van Hoesen, G., and Ksiezak-Reding, H. (2004) Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* **24**: 2304-2312.
- Lee, M.K., and Cleveland, D.W. (1996) Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* **19**: 187-217.
- Lee, M.K., Xu, Z., Wong, P.C., and Cleveland, D.W. (1993) Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol* **122**: 1337-1350.
- Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (1992) The disordered neuronal cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* **2**: 653-656.
- Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., Jr., and Trojanowski, J.Q. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* **251**: 675-678.
- Lee, V.M., Goedert, M., and Trojanowski, J.Q. (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* **24**: 1121-1159.
- Leger, J.G., Brandt, R., and Lee, G. (1994) Identification of tau protein regions required for process formation in PC12 cells. *J Cell Sci* **107** ( Pt 12): 3403-3412.
- Leterrier, J.F., Liem, R.K., and Shelanski, M.L. (1982) Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: a possible mechanism for intraorganellar bridging. *J Cell Biol* **95**: 982-986.
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W.L., Yen, S.H., Dickson, D.W., Davies, P., and Hutton, M. (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* **25**: 402-405.
- Lewis, S.A., Wang, D.H., and Cowan, N.J. (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* **242**: 936-939.
- Lichtenberg-Kraag, B., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Steiner, B., Schroter, C., Gustke, N., Meyer, H.E., and Mandelkow, E. (1992) Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5384-5388.
- Lim, F., Hernandez, F., Lucas, J.J., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., and Avila, J. (2001) FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci* **18**: 702-714.
- Lin, W.L., Lewis, J., Yen, S.H., Hutton, M., and Dickson, D.W. (2003) Filamentous tau in oligodendrocytes and astrocytes of transgenic mice expressing the human tau isoform with the P301L mutation. *Am J Pathol* **162**: 213-218.

- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984a) The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J Biol Chem* **259**: 12241-12245.
- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984b) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* **259**: 5301-5305.
- Litersky, J.M., and Johnson, G.V. (1992) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* **267**: 1563-1568.
- Litersky, J.M., and Johnson, G.V. (1995) Phosphorylation of tau in situ: inhibition of calcium-dependent proteolysis. *J Neurochem* **65**: 903-911.
- Litman, P., Barg, J., Rindzoonski, L., and Ginzburg, I. (1993) Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* **10**: 627-638.
- Litman, P., Barg, J., and Ginzburg, I. (1994) Microtubules are involved in the localization of tau mRNA in primary neuronal cell cultures. *Neuron* **13**: 1463-1474.
- Lovestone, S., and Reynolds, C.H. (1997) The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* **78**: 309-324.
- Lovestone, S., Hartley, C.L., Pearce, J., and Anderton, B.H. (1996) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* **73**: 1145-1157.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Lu, M., and Kosik, K.S. (2001) Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell* **12**: 171-184.
- Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R., and Avila, J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* **20**: 27-39.
- Ludin, B., and Matus, A. (1993) The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and dendritic plasticity. *Hippocampus* **3 Spec No**: 61-71.
- Luo, L. (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 601-635.
- Maas, T., Eidenmuller, J., and Brandt, R. (2000) Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* **275**: 15733-15740.

- Maciejewski, P.M., Peterson, F.C., Anderson, P.J., and Brooks, C.L. (1995) Mutation of serine 90 to glutamic acid mimics phosphorylation of bovine prolactin. *J Biol Chem* **270**: 27661-27665.
- Mandelkow, E.M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J.R., and Mandelkow, E. (1992) Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* **314**: 315-321.
- Mandelkow, E.M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1995) Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging* **16**: 355-362; discussion 362-353.
- Mandelkow, E.M., Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., and Mandelkow, E. (2003) Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* **24**: 1079-1085.
- Mandell, J.W., and Banker, G.A. (1995) The microtubule cytoskeleton and the development of neuronal polarity. *Neurobiol Aging* **16**: 229-237; discussion 238.
- Mandell, J.W., and Banker, G.A. (1996a) A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* **16**: 5727-5740.
- Mandell, J.W., and Banker, G.A. (1996b) Microtubule-associated proteins, phosphorylation gradients, and the establishment of neuronal polarity. *Perspect Dev Neurobiol* **4**: 125-135.
- Mattson, M.P. (1999) Establishment and plasticity of neuronal polarity. *J Neurosci Res* **57**: 577-589.
- Mattson, M.P., and Partin, J. (1999) Evidence for mitochondrial control of neuronal polarity. *J Neurosci Res* **56**: 8-20.
- Matus, A. (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci* **11**: 29-44.
- Matus, A. (1994) Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci* **17**: 19-22.
- Mawal-Dewan, M., Henley, J., Van de Voorde, A., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1994) The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem* **269**: 30981-30987.
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T.H., and Rothman, J.E. (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**: 153-159.
- Meichsner, M., Doll, T., Reddy, D., Weisshaar, B., and Matus, A. (1993) The low molecular weight form of microtubule-associated protein 2 is transported into both axons and dendrites. *Neuroscience* **54**: 873-880.

- Meixner, A., Haverkamp, S., Wassle, H., Fuhrer, S., Thalhammer, J., Kropf, N., Bittner, R.E., Lassmann, H., Wiche, G., and Probst, F. (2000) MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* **151**: 1169-1178.
- Micheva, K.D., Holz, R.W., and Smith, S.J. (2001) Regulation of presynaptic phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by neuronal activity. *J Cell Biol* **154**: 355-368.
- Minelli, A., Brecha, N.C., Karschin, C., DeBiasi, S., and Conti, F. (1995) GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *J Neurosci* **15**: 7734-7746.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**: 237-242.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* **1**: 761-772.
- Monaghan, M.M., Trimmer, J.S., and Rhodes, K.J. (2001) Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K<sup>+</sup> channel alpha and beta subunits in rat hippocampal formation. *J Neurosci* **21**: 5973-5983.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K., and Ihara, Y. (1995a) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* **270**: 823-829.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K., and Ihara, Y. (1995b) Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol Aging* **16**: 365-371; discussion 371-380.
- Morris, R.L., and Hollenbeck, P.J. (1995) Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* **131**: 1315-1326.
- Mulot, S.F., Hughes, K., Woodgett, J.R., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (1994) PHF-tau from Alzheimer's brain comprises four species on SDS-PAGE which can be mimicked by in vitro phosphorylation of human brain tau by glycogen synthase kinase-3 beta. *FEBS Lett* **349**: 359-364.
- Munoz-Montano, J.R., Moreno, F.J., Avila, J., and Diaz-Nido, J. (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett* **411**: 183-188.
- Murthy, M., Garza, D., Scheller, R.H., and Schwarz, T.L. (2003) Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists. *Neuron* **37**: 433-447.

- Nakada, C., Ritchie, K., Oba, Y., Nakamura, M., Hotta, Y., Iino, R., Kasai, R.S., Yamaguchi, K., Fujiwara, T., and Kusumi, A. (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat Cell Biol* **5**: 626-632.
- Nath, R., Davis, M., Probert, A.W., Kupina, N.C., Ren, X., Schielke, G.P., and Wang, K.K. (2000) Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **274**: 16-21.
- Nelson, P.T., Stefansson, K., Gulcher, J., and Saper, C.B. (1996) Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* **67**: 1622-1632.
- 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.
- Nishimura, I., Yang, Y., and Lu, B. (2004) PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell* **116**: 671-682.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**: 1235-1244.
- Noble, M., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (1989) The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J Cell Biol* **109**: 3367-3376.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahljanian, M., Lau, L.F., and Duff, K. (2003) Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* **38**: 555-565.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**: 409-421.
- Otvos, L., Jr., Feiner, L., Lang, E., Szendrei, G.I., Goedert, M., and Lee, V.M. (1994) Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* **39**: 669-673.
- 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.
- Parlati, F., Varlamov, O., Paz, K., McNew, J.A., Hurtado, D., Sollner, T.H., and Rothman, J.E. (2002) Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi

- transport based on combinatorial specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5424-5429.
- Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., and Tsai, L.H. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**: 615-622.
- Pei, J.J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., and Cowburn, R.F. (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 1010-1019.
- 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.
- Pope, W., Enam, S.A., Bawa, N., Miller, B.E., Ghanbari, H.A., and Klein, W.L. (1993) Phosphorylated tau epitope of Alzheimer's disease is coupled to axon development in the avian central nervous system. *Exp Neurol* **120**: 106-113.
- Poyatos, I., Ruberti, F., Martinez-Maza, R., Gimenez, C., Dotti, C.G., and Zafra, F. (2000) Polarized distribution of glycine transporter isoforms in epithelial and neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* **15**: 99-111.
- Prickett, K.S., Amberg, D.C., and Hopp, T.P. (1989) A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques* **7**: 580-589.
- Probst, A., Gotz, J., Wiederhold, K.H., Tolnay, M., Mistl, C., Jaton, A.L., Hong, M., Ishihara, T., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Crowther, R.A., Spillantini, M.G., Burki, K., and Goedert, M. (2000) Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)* **99**: 469-481.
- Rendon, A., Jung, D., and Jancsik, V. (1990) Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochem J* **269**: 555-556.
- Riederer, B.M., and Binder, L.I. (1994) Differential distribution of tau proteins in developing cat cerebellum. *Brain Res Bull* **33**: 155-161.
- Riederer, B., Cohen, R., and Matus, A. (1986) MAP5: a novel brain microtubule-associated protein under strong developmental regulation. *J Neurocytol* **15**: 763-775.
- Riederer, B.M., Mourton-Gilles, C., Frey, P., Delacourte, A., and Probst, A. (2001) Differential phosphorylation of tau proteins during kitten brain development and Alzheimer's disease. *J Neurocytol* **30**: 145-158.



- Rivera, J.F., Ahmad, S., Quick, M.W., Liman, E.R., and Arnold, D.B. (2003) An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K<sup>+</sup> channels mediates dendritic targeting. *Nat Neurosci* **6**: 243-250.
- Rosner, H., Rebhan, M., Vacun, G., and Vanmechelen, E. (1995) Developmental expression of tau proteins in the chicken and rat brain: rapid down-regulation of a paired helical filament epitope in the rat cerebral cortex coincides with the transition from immature to adult tau isoforms. *Int J Dev Neurosci* **13**: 607-617.
- Ruberti, F., and Dotti, C.G. (2000) Involvement of the proximal C terminus of the AMPA receptor subunit GluR1 in dendritic sorting. *J Neurosci* **20**: RC78.
- Sahara, N., Lewis, J., DeTure, M., McGowan, E., Dickson, D.W., Hutton, M., and Yen, S.H. (2002) Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau: alteration of phosphorylation and solubility. *J Neurochem* **83**: 1498-1508.
- Sampo, B., Kaech, S., Kunz, S., and Banker, G. (2003) Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* **37**: 611-624.
- Sanchez, C., Diaz-Nido, J., and Avila, J. (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* **61**: 133-168.
- Sandoval, I.V., and Vandekerckhove, J.S. (1981) A comparative study of the in vitro polymerization of tubulin in the presence of the microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *J Biol Chem* **256**: 8795-8800.
- Sawa, A., Oyama, F., Matsushita, M., and Ihara, Y. (1994) Molecular diversity at the carboxyl terminus of human and rat tau. *Brain Res Mol Brain Res* **27**: 111-117.
- Schoenfeld, T.A., McKerracher, L., Obar, R., and Vallee, R.B. (1989) MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci* **9**: 1712-1730.
- Schraen-Maschke, S., Dhaenens, C.M., Delacourte, A., and Sablonniere, B. (2004) Microtubule-associated protein tau gene: a risk factor in human neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis* **15**: 449-460.
- Sengupta, A., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Singh, T.J. (1997) Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem* **167**: 99-105.
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1998) Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys* **357**: 299-309.
- Serrano, L., Montejó de Garcini, E., Hernandez, M.A., and Avila, J. (1985) Localization of the tubulin binding site for tau protein. *Eur J Biochem* **153**: 595-600.

- Sharma, N., Kress, Y., and Shafit-Zagardo, B. (1994) Antisense MAP-2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neuritic elongation in pre-existing neurites of rat cortical neurons. *Cell Motil Cytoskeleton* **27**: 234-247.
- Shaw, G. (1991) Neurofilament proteins. In: *The neuronal cytoskeleton*, ed R.D. Burgoyne. Wiley-Liss, New York, 185-214.
- Shaw, G., Banker, G.A., and Weber, K. (1985) An immunofluorescence study of neurofilament protein expression by developing hippocampal neurons in tissue culture. *Eur J Cell Biol* **39**: 205-216.
- Shi, S.H., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2003) Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* **112**: 63-75.
- Sloboda, R.D., Dentler, W.L., and Rosenbaum, J.L. (1976) Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochemistry* **15**: 4497-4505.
- Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* **21**: 428-433.
- 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.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Van Lommel, A., Loos, R., and Van Leuven, F. (1999) Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* **155**: 2153-2165.
- 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.
- Stowell, J.N., and Craig, A.M. (1999) Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains. *Neuron* **22**: 525-536.
- Suter, D.M., and Forscher, P. (2000) Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* **44**: 97-113.
- Szendrei, G.I., Lee, V.M., and Otvos, L., Jr. (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.
- Takei, Y., Kondo, S., Harada, A., Inomata, S., Noda, T., and Hirokawa, N. (1997) Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J Cell Biol* **137**: 1615-1626.

- 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.
- Tanemura, K., Akagi, T., Murayama, M., Kikuchi, N., Murayama, O., Hashikawa, T., Yoshiike, Y., Park, J.M., Matsuda, K., Nakao, S., Sun, X., Sato, S., Yamaguchi, H., and Takashima, A. (2001) Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiol Dis* **8**: 1036-1045.
- Tanemura, K., Murayama, M., Akagi, T., Hashikawa, T., Tominaga, T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H., and Takashima, A. (2002) Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci* **22**: 133-141.
- Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Chui, D.H., Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, K., Murayama, M., Ishiguro, K., Planel, E., Sato, S., Hashikawa, T., and Takashima, A. (2002) Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13896-13901.
- Tienari, P.J., De Strooper, B., Ikonen, E., Simons, M., Weidemann, A., Czech, C., Hartmann, T., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C.L., Van Leuven, F., Beyreuther, K., and Dotti, C.G. (1996) The beta-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *Embo J* **15**: 5218-5229.
- Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1995) Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *Faseb J* **9**: 1570-1576.
- Trojanowski, J.Q., Ishihara, T., Higuchi, M., Yoshiyama, Y., Hong, M., Zhang, B., Forman, M.S., Zhukareva, V., and Lee, V.M. (2002) Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex: transgenic mice provide insights into mechanisms underlying a common tauopathy in an ethnic minority on Guam. *Exp Neurol* **176**: 1-11.
- Tsai, L.H., Delalle, I., Caviness, V.S., Jr., Chae, T., and Harlow, E. (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**: 419-423.
- Tucker, R.P., Binder, L.I., and Matus, A.I. (1988) Neuronal microtubule-associated proteins in the embryonic avian spinal cord. *J Comp Neurol* **271**: 44-55.
- Ulloa, L., Diez-Guerra, F.J., Avila, J., and Diaz-Nido, J. (1994) Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* **61**: 211-223.
- Vouyiouklis, D.A., and Brophy, P.J. (1995) Microtubule-associated proteins in developing oligodendrocytes: transient expression of a MAP2c isoform in oligodendrocyte precursors. *J Neurosci Res* **42**: 803-817.

- Wandosell, F., and Avila, J. (1987) Microtubule-associated proteins present in different developmental stages of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biochem* **35**: 83-92.
- Wang, Z.Y., Wang, F., Sellers, J.R., Korn, E.D., and Hammer, J.A., 3rd (1998) Analysis of the regulatory phosphorylation site in *Acanthamoeba* myosin IC by using site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15200-15205.
- Watanabe, A., Hasegawa, M., Suzuki, M., Takio, K., Morishima-Kawashima, M., Titani, K., Arai, T., Kosik, K.S., and Ihara, Y. (1993) In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J Biol Chem* **268**: 25712-25717.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 1858-1862.
- West, A.E., Neve, R.L., and Buckley, K.M. (1997a) Identification of a somatodendritic targeting signal in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor. *J Neurosci* **17**: 6038-6047.
- West, A.E., Neve, R.L., and Buckley, K.M. (1997b) Targeting of the synaptic vesicle protein synaptobrevin in the axon of cultured hippocampal neurons: evidence for two distinct sorting steps. *J Cell Biol* **139**: 917-927.
- Williamson, R., Scales, T., Clark, B.R., Gibb, G., Reynolds, C.H., Kellie, S., Bird, I.N., Vardell, I.M., Sheppard, P.W., Everall, I., and Anderton, B.H. (2002) Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J Neurosci* **22**: 10-20.
- Winckler, B., Forscher, P., and Mellman, I. (1999) A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* **397**: 698-701.
- Wischik, C.M., Novak, M., Thogersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., and Klug, A. (1988) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4506-4510.
- Witman, G.B., Cleveland, D.W., Weingarten, M.D., and Kirschner, M.W. (1976) Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 4070-4074.
- 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.
- Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C.K., and Greenberg, M.E. (1996) Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci* **16**: 5425-5436.

- Xu, Z., Marszalek, J.R., Lee, M.K., Wong, P.C., Folmer, J., Crawford, T.O., Hsieh, S.T., Griffin, J.W., and Cleveland, D.W. (1996) Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter. *J Cell Biol* **133**: 1061-1069.
- 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 (Berl)* **92**: 232-241.
- Yamauchi, P.S., Flynn, G.C., Marsh, R.L., and Purich, D.L. (1993) Reduction in microtubule dynamics in vitro by brain microtubule-associated proteins and by a microtubule-associated protein-2 second repeated sequence analogue. *J Neurochem* **60**: 817-826.
- Yang, L.S., and Ksiezak-Reding, H. (1995) Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments. *Eur J Biochem* **233**: 9-17.
- Yoshida, H., and Ihara, Y. (1993) Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau. *J Neurochem* **61**: 1183-1186.
- Zhang, B., Higuchi, M., Yoshiyama, Y., Ishihara, T., Forman, M.S., Martinez, D., Joyce, S., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2004) Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy. *J Neurosci* **24**: 4657-4667.
- Zhang, J., and Johnson, G.V. (2000) Tau protein is hyperphosphorylated in a site-specific manner in apoptotic neuronal PC12 cells. *J Neurochem* **75**: 2346-2357.
- Zheng-Fischhofer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Illenberger, S., Godemann, R., and Mandelkow, E. (1998) Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta 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**: 542-552.