

Université de Montréal

**Caractérisation de modèles Alzheimer de *C. elegans* transgéniques,
exprimant la protéine Tau humaine dans leurs motoneurones
GABAergiques**

Par

Emilien Schramm

Département de Neurosciences

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en Neurosciences

Mars, 2020

© Emilien Schramm, 2020

Université de Montréal

Unité académique : Département de Neurosciences, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation de modèles Alzheimer de *C. elegans* transgéniques, exprimant la protéine Tau humaine dans leurs motoneurones GABAergiques

Présenté par

Emilien Schramm

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Martine Tétreault
Président-rapporteur

Dr Nicole Leclerc
Directeur de recherche

Dr Alex Parker
Codirecteur

Dr Jonathan Brouillette
Membre du jury

Résumé

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative déterminée par deux caractéristiques : les plaques extracellulaires composées d'amyloïde- β et l'accumulation intracellulaire de tau hyperphosphorylée, appelée enchevêtrements neurofibrillaires. Malgré le nombre important d'études, la nature de la toxicité des espèces tau hyperphosphorylée et hypophosphorylée reste mal connue. Notre projet de recherche vise à caractériser quel état de phosphorylation de la tau contribue le plus à la toxicité neuronale ainsi que d'identifier les mécanismes sous-jacents. Pour répondre à ces objectifs, nous avons généré des modèles transgéniques de *C. elegans* exprimant soit une tau hyperphosphorylée humaine (12 glutamates pour mimer l'hyperphosphorylation de la tau trouvée chez des patients Alzheimer), une tau sauvage, ou une tau hypophosphorylée (12 alanines pour mimer l'hypophosphorylation), dans les motoneurones GABAergiques. Ensuite, pour caractériser nos modèles, nous avons mesuré leur comportement principalement avec des tests de locomotion en utilisant le logiciel WormLab. Nos résultats ont montré que la tau phosphorylée est l'espèce la plus toxique car la souche hyperP a montré une perturbation du système locomoteur se traduisant par une neurodégénérescence ainsi que des problèmes développementaux (longueur des vers). Puis nous avons testé certains médicaments utilisés dans des modèles de tauopathies, afin d'identifier des voies biologiques impliquées dans la toxicité de la tau hyperphosphorylée. Pour conclure, nos modèles vont être des outils utiles pour identifier des modificateurs génétiques et pharmacologiques dans la toxicité de la tau.

Mots-clés : Tau, Alzheimer, Hyperphosphorylation, Hypophosphorylation, *C. elegans*, tauopathies, motoneurones GABAergiques

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by two hallmarks: extracellular plaques composed of amyloid- β ($A\beta$) deposits and intraneuronal accumulation of hyper and abnormal phosphorylated tau, also called neurofibrillary tangles (NFT). Despite many decades of research, the nature hypophosphorylated or hyperphosphorylated Tau toxicity remains ill understood. Our research project aims to characterize which state of Tau phosphorylation contributes to neuronal toxicity and identify the underlying mechanisms. To assess these objectives, we generated transgenic *C. elegans* models expressing either a human hyperphosphorylated tau (incorporation of 12 glutamate residues to mimic Tau hyperphosphorylation found in AD's patients) human wild type Tau, or a human hypophosphorylated tau (incorporation of 12 alanine residues to mimic Tau hypophosphorylation) in the GABAergic motoneurons. Then, to characterize our models, we measured their behavior mainly with locomotion's test using WormLab software. Our results showed that hyperphosphorylation of tau is the most toxic species for our models because hyperP strain showed an impair in the locomotor system translating into neurodegeneration, as well as developmental problems such as worm length. Then we tested some drugs used in tauopathies *C. elegans* models to see if we could identify some biological pathways implicated in the toxicity. To conclude, our models may be a useful tool to identify genetic and pharmacological modifiers of tau toxicity.

Keywords : Tau, Alzheimer, Hyperphosphorylation, Hypophosphorylation, *C. elegans*, tauopathies, Gabaergic motorneurons

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xii
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 : Introduction	1
1. La Maladie d'Alzheimer : Généralités.....	2
1.1 Histoire et Symptômes de la Maladie.....	2
1.2 Les Conséquences Sociales et Économiques de la Maladie	4
1.3 Les Causes de la Maladie d'Alzheimer	4
1.3.1 Les Cas Familiaux.....	5
1.3.2 Les Cas Sporadiques	6
2. Les Deux Principales Lésions Neurologiques de la Maladie.....	7
2.1 Le Peptide Bêta-Amyloïde	7
2.1.1 En Condition Physiologique	7
2.1.2 En Condition Pathologique	10
2.2 La Protéine Tau	17
2.2.1 En Condition Physiologique	17
2.2.1.1 Structure	17
2.2.1.2 Localisation	19
2.2.1.3 Fonctions.....	19
2.2.1.4 La Phosphorylation de la Tau	24

2.2.2 En Condition Pathologique	25
2.2.2.1 La Théorie de l'Hyperphosphorylation de Tau	25
2.2.2.2 La Toxicité de la Tau Hyperphosphorylée	26
2.2.2.3 L'hyperphosphorylation de la Tau est Toxique ?	29
2.2.2.4 La Tau Hypophosphorylée est Toxique ?	31
2.2.2.5 Les Tauopathies	33
2.3 L'interaction entre la protéine Tau et le peptide A β dans la Maladie d'Alzheimer ...	34
3. Modèle Expérimental : le <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>)	35
3.1 Généralités sur le <i>C. elegans</i>	35
3.2 Anatomie du <i>C. elegans</i>	37
3.3 Le Système Nerveux du <i>C. elegans</i>	39
3.4 Locomotion du Ver : GABA et Acétylcholine	40
3.5 Le <i>C. elegans</i> : Un Bon Modèle	41
3.6 Les Modèles <i>C. elegans</i> de Tauopathies	43
4. Objectifs de l'étude	46
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	48
2.1 Génération des souches et maintenance	48
2.2 Séquençage des souches	50
2.3 RT-PCR	51
2.4 Western Blot	52
2.5 Test de Paralysie	53
2.6 WormTracker®	53
2.7 WormLab® : Vitesse de Nage	53
2.8 Test de Neurodégénérescence	54

2.9 WormLab® : Taille des Vers.....	54
2.10 Test de Progéniture	54
2.11 Lifespan	55
2.12 Utilisation des Drogues	55
2.13 Analyse Statistique	56
Chapitre 3 : Résultats	56
3.1 Génération des souches transgéniques.....	56
3.1.1 Intégration et séquençage.....	56
3.1.2 Expression de la protéine Tau	61
3.2 Caractérisation des modèles	64
3.2.1 La motilité des vers transgéniques	64
3.2.1.1 Test de Paralysie	64
3.2.1.2 WormTracker®	67
3.2.1.3 WormLab®	68
3.2.2 Neurodégénérescence des neurones moteurs dans les souches transgéniques	72
3.2.3 L'apparition de problèmes développementaux chez les souches transgéniques. ...	76
3.2.3.1 La souche exprimant la tau humaine hyperP possède une taille inférieure aux autres modèles	76
3.2.3.2 Les souches tau WT et tau hyperP pondent moins d'œufs que les autres, et possèdent une durée de vie légèrement raccourcie.	78
3.3 Découverte de drogues pour la protéine Tau	84
Chapitre 4 : Discussion	90
4.1 Un peu de contexte	90
4.2 La génération des souches transgéniques	90

4.3 La vitesse des souches transgéniques	91
4.3.1 WormTracker®	91
4.3.2 WormLab®	92
4.4 Test de Neurodégénérescence	93
4.5 Les problèmes développementaux de nos souches et le potentiel lien avec l'insuline..	94
4.5.1 La voie de l'insuline chez le <i>C.elegans</i>	95
4.5.2 Le lien entre l'insuline et la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer	97
4.5.3 Le possible lien entre la protéine tau et l'insuline dans notre souche hyperP.	99
4.6 La protéine tau n'affecte pas ou peu la durée de vie des vers	100
4.7 La question de l'agrégation dans notre souche hyperP.....	101
4.8 Perspectives Futures.....	102
4.9 Conclusion	104
Références bibliographiques	105

Liste des tableaux

Tableau 1. – Liste des principaux modèles de *C. elegans* pour les Tauopathies. 45

Liste des figures

Figure 1. –	Distribution des NFTs et plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer	3
Figure 2. –	Classification par l'âge de personne ayant développée Alzheimer en 2019	6
Figure 3. –	Les voies de clivage du précurseur du peptide bêta amyloïde.	10
Figure 4. –	Représentation schématique du processus d'agrégation du peptide A β ainsi que de l'hexapeptide permettant sa dimérisation.	13
Figure 5. –	Représentation schématique des six isoformes de la protéine tau chez l'humain. 18	
Figure 6. –	Représentation schématique des diverses fonctions de la protéine tau en condition physiologique versus en condition pathologique.....	28
Figure 7. –	Représentation schématique de l'anatomie générale du <i>Caenorhabditis elegans</i> 38	
Figure 8. –	Représentation schématique de quelques modèles de <i>C. elegans</i> utilisés dans diverses maladies neurodégénératives	42
Figure 9. –	Construction des modèles transgéniques de <i>C. elegans</i>	59
Figure 10. –	Expression du transgène codant pour la tau dans le <i>C. elegans</i>	62
Figure 11. –	Mesure de la motricité des souches transgéniques avec le logiciel WormTracker® et les tests de paralysie.	67
Figure 12. –	Mesure de la vitesse de nage des souches transgéniques par le logiciel WormLab® 71	
Figure 13. –	Neurodégénérescence des neurones moteurs GABAergiques pour la souche hyperP aux jours 5 et 9 adulte.....	75
Figure 14. –	La souche hyperP présente une perturbation au niveau de la taille des vers tout au long de la vie des animaux.....	78
Figure 15. –	La souche tau hyperP présente une diminution du nombre de progéniture ainsi qu'une durée de vie légèrement affectée.	81
Figure 16. –	Utilisation de 4 drogues visant à améliorer le phénotype moteur de la souche hyperP 87	

- Figure 17. – Représentation schématique de la voie biologique de l'insuline chez le *C. elegans*.**
96
- Figure 18. – Modèle de régulation de la signalisation de l'insuline par la protéine tau 98**

Liste des sigles et abréviations

- **3R** : 3 répétitions
- **4R** : 4 répétitions
- **AC** : anticorps
- **AD** : Alzheimer's disease
- **ADAM** : *a disintegrin and metalloprotease*, une disintégrine et métalloprotéase
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **AICD** : *APP intracellular domain*, domaine intracellulaire APP
- **AMPK** : *AMP activated protein kinase*, protéine kinase active par AMP
- **APOE** : apolipoprotéine E
- **APP** : *amyloid precursor protein*, protéine précurseur de l'amyloïde
- **ARN** : acide ribonucléique
- **ARNi** : acide ribonucléique interférence
- **ARNm** : acide ribonucléique messenger
- **A β** : bêta amyloïde
- **BACE-1** : *beta site APP cleaving protein*, protéine clivant le site bêta d'APP
- **C. elegans** : *Caenorhabditis elegans*
- **CaMKII** : *calmodulin dependent protein kinase II*, protéine kinase II dépendante de la calmoduline
- **CBD** : *corticobasal degeneration*, dégénérescence corticobasale
- **Cdk5** : *cycline dependent kinase*, kinase cycline dépendante
- **E. coli** : *Escherichia coli*
- **FPN** : ferroportine
- **FTLD** : *frontotemporal lobar degeneration*, dégénérescence des lobes frontotemporaux
- **GABA** : acide γ -aminobutyrique
- **GFP** : *green fluorescent protein*, protéine verte fluorescente
- **GSK3 β** : *glycogen synthase kinase 3 β* , kinase glycogène synthétase 3 β
- **HyperP** : hyperphosphorylée

- **HypoP** : hypophosphorylée
- **KD** : *knockdown*
- **KO** : *knock out*
- **LTD** : *long-term depression*, dépression à long terme
- **LTP** : *long-term potentiation*, potentialisation à long terme
- **MA** : maladie d'Alzheimer
- **MAPK** : *mitogen activated protein kinase*, protéine kinase activée par un mitogène
- **MAPT** : *microtubule associated-protein Tau*, protéine tau associée aux microtubules
- **MT** : microtubules
- **NFT** : neurofibrillaires tangles, enchevêtrements neurofibrillaires
- **NGM**: *nematode growth medium*, milieu de croissance pour les nématodes
- **PET** : *positron emission tomography*, émission de positron par tomographie
- **PHF** : *paired helical filaments*, filaments pairés hélicoïdaux
- **PKC** : *protein kinase c*, protéine kinase C
- **PP2A** : protéine phosphatase 2A
- **Pro** : proline
- **PS1** : *presenilin 1*, préséniline 1
- **PS2** : *presenilin 2*, préséniline 2
- **PSD95** : *post-synaptic density protein 95*, protéine 95 de densité post-synaptique
- **PSP** : *progressive supranuclear palsy*, paralysie supranucléaire progressive
- **ROS** : *reactive oxidative species*, espèces oxydatives réactives
- **Ser** : serine
- **SLA** : sclérose latérale amyotrophique
- **TA** : *tannic acid*, acide tannique
- **Thr** : threonine
- **Tyr** : tyrosine
- **WT** : *wild type*, sauvage

Remerciements

Je tiens à remercier les personnes suivantes :

- Nicole Leclerc et Alex Parker pour m'avoir offert la possibilité de faire ma maîtrise avec eux, de m'avoir donné de bons conseils lors des moments de doutes ainsi que m'avoir permis de participer à plusieurs congrès dont un international à Los Angeles.
- Julie Pilliod pour son aide précieuse lors des WesternBlot et autres expériences dans le laboratoire.
- Les étudiants et membres du laboratoire Parker pour leur bonne humeur, conseil et soutien. Un merci tout particulier pour Audrey Labarre pour avoir pris le temps de m'écouter, et aidé un nombre incalculable de fois, surtout pour la machine à plates. Merci aussi à Gilles Tossing pour son expertise avec le logiciel WormLab qui m'a permis de gagner un temps précieux pour mes analyses.
- Mes parrains sur mon comité, à savoir Louis-Éric Trudeau et Karl Fernandes, pour leurs conseils pertinents et leur intérêt pour mon projet.
- Martine Tétreault et Jonathan Brouillette pour m'avoir accordé un peu de leur temps afin d'évaluer mon mémoire.
- Marie-Laure Clénet pour ses précieux conseils et son soutien lors de la rédaction de ce mémoire.

Chapitre 1 : Introduction

1. La Maladie d'Alzheimer : Généralités

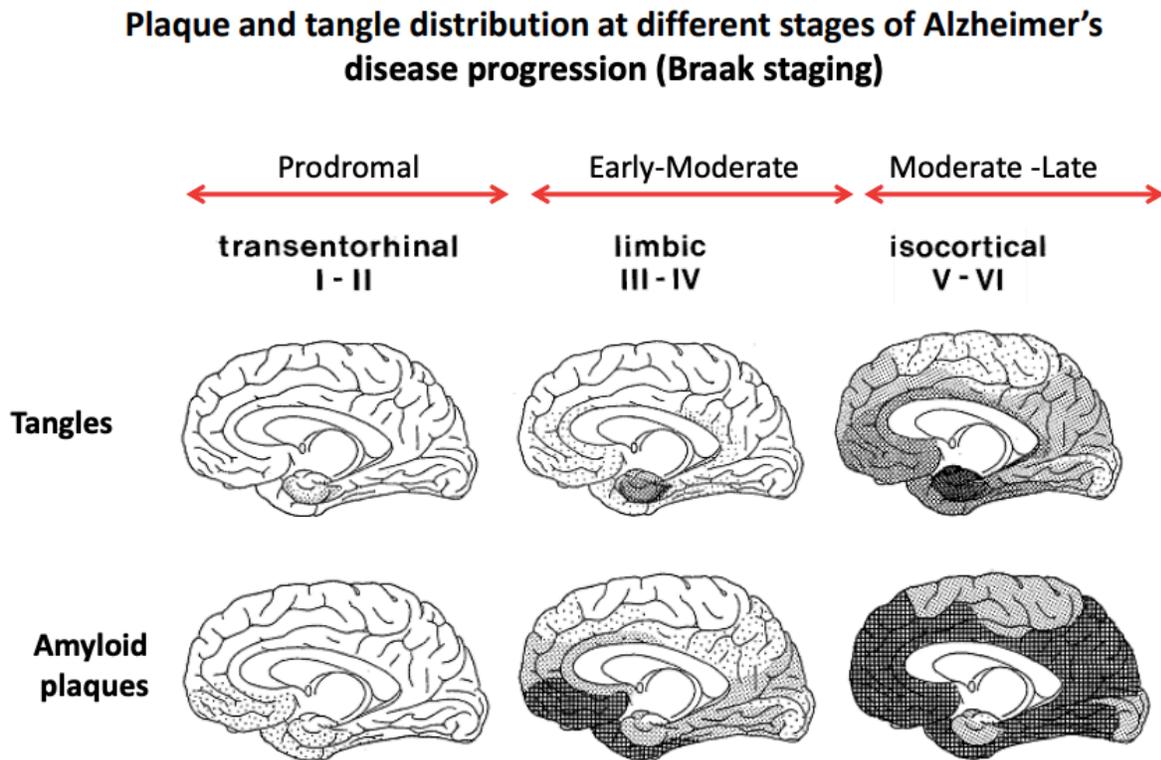
1.1 Histoire et Symptômes de la Maladie

Aloysius Alzheimer était un neuropathologiste allemand qui, en 1907, décrit les symptômes d'une patiente admise à l'asile psychiatrique de Francfort, âgée de 51 ans et connue sous le nom d'Auguste Deter (Bondi, Edmonds et al. 2017). Ce fût la première description des symptômes caractérisant la maladie d'Alzheimer. À la mort d'Auguste, le médecin allemand pratiqua une autopsie afin d'examiner le cerveau à l'aide d'une technique de coloration à l'argent. Il y observa des enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) ainsi que des plaques neuritiques amyloïdes, qui devinrent plus tard, les lésions neurologiques caractéristiques de cette maladie.

En ce qui concerne les symptômes cliniques, bien que la perte de mémoire soit associée à tous les cas d'Alzheimer, le spectre des symptômes concernant cette maladie est large et hétérogène (Atri 2019). Les patients peuvent présenter de multiples problèmes fonctionnels ou comportementaux, comme par exemple un changement dans leurs émotions, un excès de violence ou bien une incapacité à accomplir les tâches du quotidien.

Pour ce qui est des lésions neurologiques à savoir les enchevêtrements neurofibrillaires (NFT) ainsi que les plaques séniles amyloïdes, ces derniers semblent pour un nombre non négligeable de patients, suivre une progression stéréotypée dans les différentes régions du cerveau. Cette découverte fût faite par l'anatomiste allemand Heiko Braak en 1991 (Braak and Braak 1991), qui mit en lumière le fait que l'on pouvait suivre la progression des plaques amyloïdes ainsi que des enchevêtrements neurofibrillaires, dans les différentes régions du cerveau. Il décrit à la fois pour les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques amyloïdes, six stades qu'on nomma par la suite les stades de Braak (Figure 1). Par ailleurs il est à noter que la protéine tau et le peptide amyloïde bêta n'ont pas la même progression et ne commencent pas leurs propagations dans les mêmes régions anatomiques du cerveau. Plus tard, des scientifiques ont pu mettre en évidence une corrélation entre la propagation des lésions neurologiques dans des parties du cerveau bien précises et les symptômes observés chez les patients (Baner, Braak et al. 1993). Par exemple, les altérations de la mémoire qui surviennent tôt dans la maladie d'Alzheimer, apparaissent aux premiers stades de Braak alors que les problèmes mentaux

surgissent aux stades plus tardifs (Grober, Dickson et al. 1999). Par ailleurs, il est important de noter que tous les patients atteints d'Alzheimer ne présentent pas une progression stéréotypée ce qui complexifie la compréhension de la maladie.



Braak, H., Braak, E. (1991)

Figure 1. – Distribution des NFTs et plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer

Légende : Représentation schématique des six stades de Braak, pour les enchevêtrements neurofibrillaires ainsi que pour les plaques amyloïdes, dans la maladie d'Alzheimer.

1.2 Les Conséquences Sociales et Économiques de la Maladie

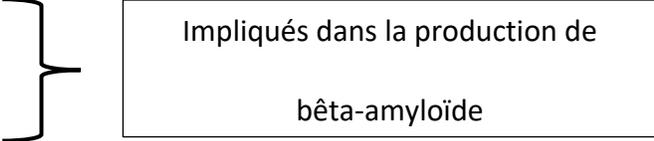
En 2019, près de 6 millions d'américains ont la maladie d'Alzheimer (MA) et les démences associées. Ce nombre a largement augmenté depuis le milieu du 20^{ème} siècle, en partie à cause de la génération « *baby boom* » qui vieillit et commence à atteindre la soixantaine. En 2017, la MA a fait plus de 120 000 morts, ce qui en a fait la sixième cause de décès aux États-Unis ainsi que la cinquième cause de décès pour les personnes de plus de 65 ans. Étant une maladie avec une progression lente dans la majorité des cas, le nombre de malade augmente chaque année, et le coût dispendieux des traitements grandit de jour en jour. Par exemple, en 2018, plus de 16 millions de familles et aides soignants ont passé environ 18,5 milliards d'heures, la plupart non rémunérées, à s'occuper des patients atteints de cette maladie. Enfin, non seulement les soins pour ces patients sont estimés à plus de 234 milliards de dollars, mais à cela s'ajoute la perte en main d'œuvre et en temps. Pour conclure, la maladie d'Alzheimer est un véritable enjeu économique avec des frais estimés en centaine de milliards de dollars et qui n'est pas près de s'arrêter étant donné que le nombre de cas va augmenter très fortement puisque les personnes les plus âgées de la génération « *baby boom* » n'ont pas plus de 73 ans en 2019, et que l'espérance de vie s'allonge et avec elle la prévalence de la maladie. Par ailleurs, il ne faut pas négliger l'impact social de cette maladie puisqu'avec une population vieillissante, devenant dépendante d'autrui, la nécessité de trouver un remède devient indispensable. (Statistiques tirées du document « 2019 *Alzheimer's disease facts and figures* » écrit par l'association sur la maladie d'Alzheimer).

1.3 Les Causes de la Maladie d'Alzheimer

À l'heure actuelle on ne connaît pas avec certitude les causes de la maladie, néanmoins, nous avons pu au fil du temps, mettre en évidence certains facteurs augmentant le risque de développer Alzheimer. On peut alors séparer les facteurs de risque en plusieurs catégories.

1.3.1 Les Cas Familiaux

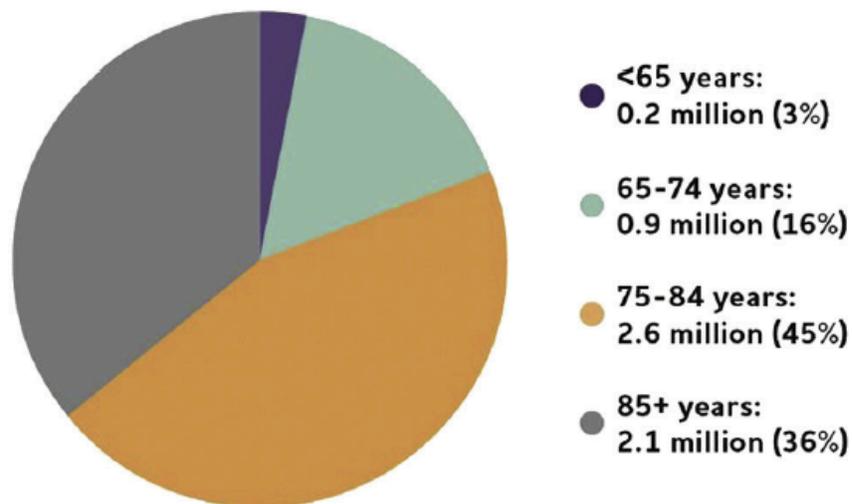
Les cas familiaux représentent une minorité chez les patients Alzheimer, malgré tout, on peut classer dans cette catégorie les facteurs génétiques associés à cette maladie. Moins de 1% (Bekris, Yu et al. 2010) des cas d'Alzheimer résultent d'une mutation dans un des trois gènes suivants :

- *Amyloid precursor protein* : *APP*
 - *Presenilin 1* : *PS1*
 - *Presenilin 2* : *PS2*
- 
- Impliqués dans la production de
bêta-amyloïde

Les personnes héritant d'une mutation dans *APP* ou *PS1* sont assurées de développer l'Alzheimer alors que pour *PS2*, les chances sont de 95% (Goldman, Hahn et al. 2011). Il est à noter que les personnes atteintes du syndrome de Down, c'est-à-dire des individus naissant avec trois copies du chromosome 21 (trisomie 21), ont une chance plus élevée de développer l'Alzheimer (Lott and Dierssen 2010). La raison est que le gène qui code pour la production d'*APP* est présent sur le chromosome 21. Or *APP*, est clivé en deux et génère des fragments de bêta-amyloïdes chez les patients atteints d'Alzheimer. Donc les personnes souffrant du syndrome de Down ont une production plus importante de peptide bêta-amyloïde dans le cerveau ce qui augmente grandement leurs chances de développer l'Alzheimer. Pour conclure sur les cas familiaux, il faut savoir que bien qu'ils ne représentent que peu de cas d'Alzheimer, contrairement aux cas sporadiques, ils induisent une maladie bien plus agressive dans sa progression. Par exemple pour les mutations sur *APP*, *PS1* ou *PS2*, les patients développent l'Alzheimer bien avant 65 ans et pour ceux ayant le syndrome de Down, dès 40 ans.

1.3.2 Les Cas Sporadiques

Les cas sporadiques représentent la majorité des patients Alzheimer si bien que l'on pense que la maladie est comme les autres pathologies chroniques, à savoir multi factoriel plutôt que dû à une seule cause. Les facteurs de risques les plus connus sont l'âge ou bien être porteur de la forme $\epsilon 4$ du gène *APOE* (pour apolipoprotéine E). Pour ce qui est de l'âge, c'est le facteur principal pour développer une forme sporadique d'Alzheimer puisque la majorité des cas sporadiques ont plus de 65 ans (Figure 2). Cela s'explique en partie car lorsque nous vieillissons, nos systèmes de contrôle qualité des protéines (protéasome, chaperonne) ou encore de dégradation ne fonctionnent plus aussi bien qu'avant, ce qui permet l'émergence de protéines mal repliées qui, s'il y en a en grande quantité, s'agrègent et auront des conséquences néfastes sur nos cellules. Par ailleurs il est important de se rappeler que bien que le vieillissement soit un facteur de risque élevé, la maladie d'Alzheimer n'est pas la conséquence de notre cerveau vieillissant (Nelson, Head et al. 2011).



Alzheimer's Association Report 2019 (2019)

Figure 2. – Classification par l'âge de personne ayant développée Alzheimer en 2019

Légende : Représentation schématique des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer en 2019 selon leurs âges. On peut observer que plus on vieillit plus le risque de développer l'Alzheimer devient grand.

Le gène *APOE* code pour une protéine du même nom qui se lie aux lipides (cholestérol) et qui a pour but de les transporter d'une cellule à l'autre. Le gène existe sous trois isoformes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. La plus commune d'entre elles est l'isoforme $\epsilon 3$ puis c'est au tour d' $\epsilon 4$. Il a été montré que posséder la forme $\epsilon 4$ augmenterait le risque de développer l'Alzheimer mais que ce n'était pas suffisant pour induire la maladie (Holtzman, Herz et al. 2012). Pour finir, il existe de nombreux facteurs de risque dit « modulables » car contrairement aux mutations génétiques ou au vieillissement, ceux-ci peuvent être évités ou atténués en fonction de notre mode de vie. En effet, pour donner quelques exemples, le diabète de type 2, l'obésité ou la cigarette sont des facteurs augmentant les risques de développer la maladie mais peuvent être évités ou bien modulés de sorte à ce que le risque soit moins grand (Baumgart, Snyder et al. 2015).

Pour conclure, pour les cas sporadiques d'Alzheimer, l'origine de la maladie est mal connue voir méconnue, mais au fil des années, les scientifiques ont pu déterminer un certain nombre de facteurs à risque qui, à eux seuls, ne déclenchent pas la maladie mais si on en accumule plusieurs, alors nos chances de développer l'Alzheimer augmentent fortement. De ce fait, la mise en place d'un traitement est difficile, de par les multiples causes pouvant entraîner le développement de cette démence.

2. Les Deux Principales Lésions Neurologiques de la Maladie

2.1 Le Peptide Bêta-Amyloïde

2.1.1 En Condition Physiologique

APP est un membre de la famille des protéines membranaires de type 1, c'est-à-dire des protéines ayant leur N-terminal du côté extracellulaire. Le gène *APP* se situe au niveau du long bras du chromosome 21 chez l'humain (Yoshikai, Sasaki et al. 1990), et la protéine est composée de trois parties principales à savoir, un domaine extracellulaire, un autre transmembranaire et pour finir une région intracellulaire.

La partie extracellulaire de la protéine, encore appelée ectodomaine, possède entre-autre une fonction d'adhésion cellulaire. En effet, l'ectodomaine se compose notamment de deux régions, E1 et E2 qui interagissent avec des protéines de la matrice extracellulaire (Small, Clarris et al. 1999). De plus, *APP* co-localise avec des intégrines à la surface des axones, soulignant son importance au niveau neuronal (Storey, Spurck et al. 1996). Par ailleurs, cette interaction d'*APP*, grâce à son ectodomaine au niveau des neurones a un rôle dans la croissance des neurites (Hung, Koo et al. 1992) et la synaptogénèse (Moya, Benowitz et al. 1994), car le niveau d'*APP* augmente lors de ces deux évènements.

Le domaine intracellulaire quant à lui, est sujet à la phosphorylation, étant composé de nombreux sites phosphorylables (Hung and Selkoe 1994). L'un de ces sites étant particulièrement important, à savoir un résidu thréonine (Thr⁶⁶⁸), qui permettrait à *APP* d'une part d'être préférentiellement transporté au niveau des terminaisons nerveuses (Muresan and Muresan 2005) et d'autre part de diminuer son interaction avec d'autres protéines, notamment Fe65 (Ando, Iijima et al. 2001, Kimberly, Zheng et al. 2005). Fe65 sert de lien entre *APP* et une autre protéine membranaire de type 1 ayant des motifs reconnaissables par les endosomes, ce qui permettrait en condition non pathologique de réguler le trafic d'*APP* et le traitement des amyloïdes (Pietrzik, Yoon et al. 2004). Par ailleurs, il a été noté que chez les patients atteints d'Alzheimer, il y avait une augmentation du nombre de fragments *APP* possédant leurs résidus Thr⁶⁶⁸ phosphorylés (Lee, Kao et al. 2003).

Le domaine intracellulaire d'*APP* a également un rôle dans la migration cellulaire ainsi que le remodelage synaptique. En effet, l'interaction *APP*/Fe65 est impliquée dans la motilité des cellules, basée sur le dynamisme de l'actine et sa modulation par *APP* (Sabo, Ikin et al. 2001). De plus, il a été démontré aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, que le complexe *APP*/Fe65 se retrouve dans la partie la plus mobile des neurones, à savoir les cônes de croissance, régions enrichies en actine (Sabo, Ikin et al. 2003).

La région intracellulaire d'*APP* a aussi un rôle dans la signalisation cellulaire comme le laisse entendre certains articles scientifiques. En effet, suite au clivage d'*APP* par la gamma sécrétase, il y aurait la production de peptides bêta amyloïdes (A β 40 et A β 42) mais la protéolyse

préséniline-dépendante se produit également à d'autres positions comme le site ϵ (A β 49) (Weidemann, Eggert et al. 2002). Ce clivage est important car il se produit dans le domaine intracellulaire d'*APP* (AICD : *APP intracellular domain*) (Selkoe and Kopan 2003). AICD semblerait migrer vers le noyau et aurait une fonction de régulateur de transcription (Gao and Pimplikar 2001), étant de nature très labile il serait stabilisé par Fe65 (Kimberly, Zheng et al. 2001). Mais cela reste à prouver car d'autres articles ont montré que par exemple, AICD n'aurait pas besoin de se trouver au niveau du noyau (Cao and Sudhof 2004), d'autres encore, montrent que la production d'AICD par la protéolyse préséniline dépendante ne serait pas requise pour avoir l'activité de signalisation d'*APP* (Hass and Yankner 2005). Par conséquent la potentielle activité de signalisation nucléaire reste à prouver. Par contre, AICD aurait bel et bien une fonction de signalisation, dont deux cibles en « *downstream* » (en aval) ont été identifiées, parmi lesquelles la neprilysine, une endopeptidase dégradant A β (Pardossi-Piquard, Petit et al. 2005). Cela suggère que la gamma sécrétase, en relâchant AICD pourrait réguler la dégradation d'A β au niveau extracellulaire, mais encore une fois cela reste à démontrer.

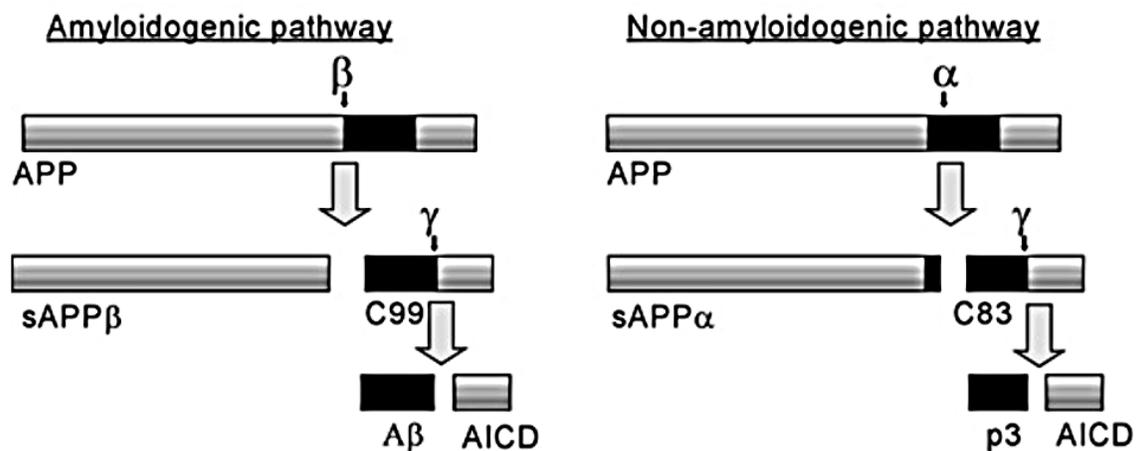
Une autre fonction connue pour le domaine intracellulaire d'*APP* serait l'apoptose. Effectivement *APP* présenterait une fonction apoptotique, surtout lorsque lui ou le fragment C-terminal (CFT β encore appelé C99 ou C100) clivé par la bêta sécrétase sont surexprimés (Yankner, Dawes et al. 1989). En effet il a été montré qu'en surexprimant le fragment C100, on remarquait une neurodégénérescence dans un cerveau de souris transgénique (Oster-Granite, McPhie et al. 1996). Une autre voie par laquelle le fragment C-terminal d'*APP* peut induire une cytotoxicité est par l'intermédiaire d'AICD (Lu, Soriano et al. 2003). En effet, après le clivage d'AICD, on pouvait observer la production de nouveaux peptides *APP* cytotoxiques.

Pour finir, l'une des dernières fonctions connues pour le domaine intracellulaire d'*APP* est qu'il participe au transport axonal. *APP* est effectivement transporté le long de l'axone via un transport rapide antérograde c'est-à-dire qu'il se dirige vers les synapses des neurones (Lazarov, Lee et al. 2002). Ce transport se ferait par la liaison d'*APP* avec une sous unité de la chaîne légère de kinésine (KLC), qui est un composant de la machinerie de transport kinésine-1 (Kamal, Stokin et al. 2000). À cela s'ajoute le fait que dans des modèles de Drosophiles ayant soit une délétion soit une surexpression de l'homologue d'*APP* (Torroja, Chu et al. 1999, Gunawardena and

Goldstein 2001), on pouvait observer la perturbation du transport axonal au niveau des neurones, phénotype très similaire à ce que l'on pouvait observer chez d'autres mouches ayant elles, des déficiences au niveau de la chaîne kinésine. C'est pour cela que des chercheurs ont proposé comme hypothèse qu'*APP* serait un récepteur spécifique de cargo de kinésine, liant la kinésine-1 à des sous-groupes de transport de cargaisons.

2.1.2 En Condition Pathologique

L'*APP*, pour être fonctionnel, va subir plusieurs événements protéolytiques notamment un orchestré par un groupe de sécrétases : l'alpha, la bêta et la gamma sécrétase (Epis, Marcello et al. 2012, Nhan, Chiang et al. 2015). Selon les sécrétases en jeu, le clivage d'*APP* peut conduire à deux voies principales, l'une est non amyloïdogène, l'autre si (Figure 3).



Charlotte Nerelius et col, 2009, *Frontiers in Bioscience*

Figure 3. – Les voies de clivage du précurseur du peptide bêta amyloïde.

Légende : Représentation schématique du clivage d'*APP* par les différentes sécrétases. Dans la voie amyloïdogène, c'est la bêta et la gamma sécrétase qui sont impliquées, alors que pour la voie non amyloïdogène, c'est l'alpha et la gamma sécrétase.

Dans les voies métaboliques d'*APP*, celle que l'on nomme non amyloïdogène est la voie initiée par l'alpha sécrétase. Le terme non amyloïdogène réfère au fait que cette dernière ne produit pas de peptide ayant comme propriété de s'agréger (Selkoe 2001). L'alpha sécrétase est

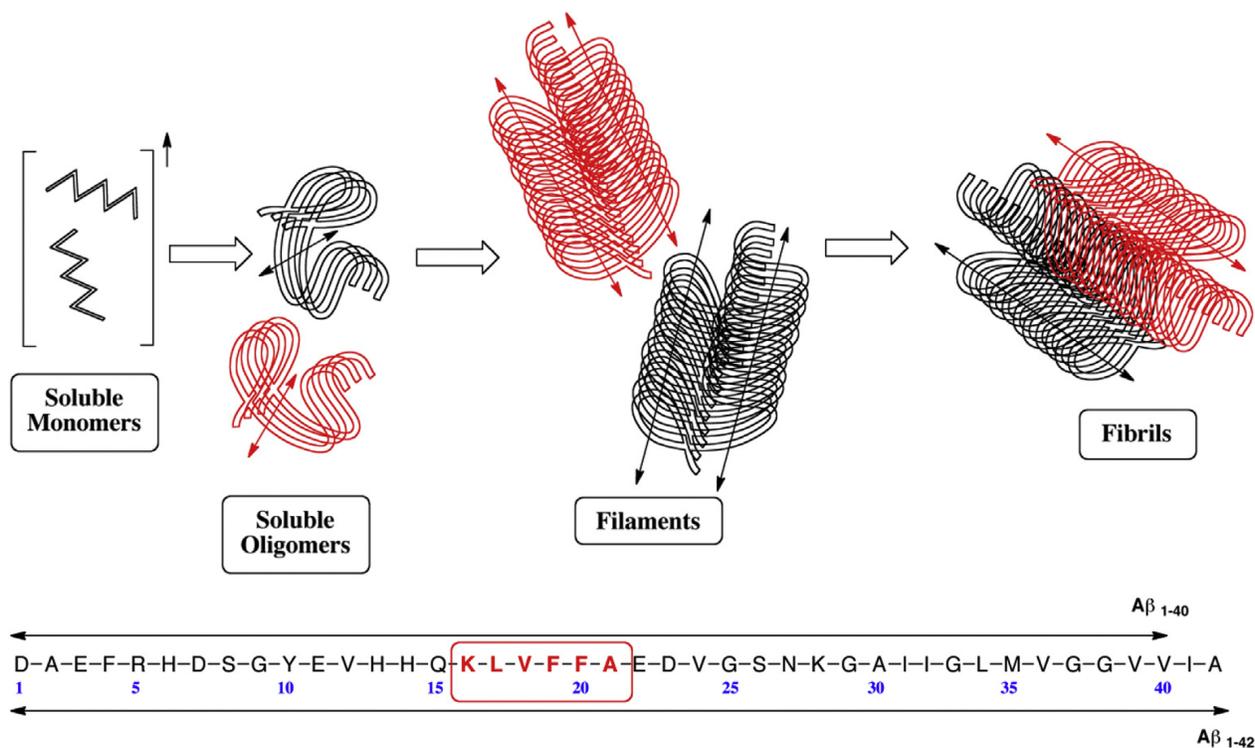
une protéine protéolytique appartenant au groupe ADAM (*a disintegrin and metalloprotease domain*) dont son plus important sous-type est l'ADAM10, ayant un rôle majeur dans la pathologie d'Alzheimer (Kuhn, Wang et al. 2010, Lichtenthaler 2011). Suite au clivage d'APP par l'alpha sécrétase, deux fragments sont produits. Le premier est un large fragment soluble d'APP que l'on nomme α -APPs. Ce fragment aurait une fonction neuroprotective et donc bénéfique, ainsi qu'un effet neurotrophique (Thinakaran and Koo 2008, Cappai 2014). Le deuxième fragment se nomme CTF-83 (pour *C-terminal fragment*) qui va être par la suite clivé une seconde fois par la gamma sécrétase afin de donner d'une part le fragment AICD (*amyloid intracellular domain*) et d'autre part un petit fragment de 3kDa nommé p3. Ces deux fragments vont avoir un effet sur la fonction neuronale (Szczepanik, Rampe et al. 2001) mais les mécanismes sous-jacents restent encore à élucider.

L'autre voie alternative de l'APP est celle qu'on dit amyloïdogène, ce qui signifie qu'elle produit le peptide A β et qu'elle est donc impliquée dans la pathologie d'Alzheimer (Cai, Wang et al. 2001, Mattson 2004). Par ailleurs il est à souligner que les deux voies métaboliques d'APP sont utilisées dans les conditions physiologiques (Sambamurti, Greig et al. 2002) mais c'est quand la voie amyloïdogène fonctionne de façon anormale que la pathologie commence. Cette voie débute par l'activité de la bêta sécrétase ou encore appelée BACE-1 (pour *Beta Site APP cleaving protein*). Son site de clivage est plus en amont que celui de l'alpha sécrétase, et en résulte la formation encore une fois de deux fragments. Le premier est un fragment soluble APP (β -APPs) plus petit que l' α -APPs, mais ayant toujours un rôle neuroprotecteur. Le deuxième fragment se nomme CTF-99 (Suh and Checler 2002, Menting and Claassen 2014) qui sera lui aussi clivé par la gamma sécrétase pour donner un AICD ainsi que le peptide A β (Selkoe 1993, Selkoe 2001).

La première fois que l'on a tenté d'expliquer comment l'A β pouvait avoir un rôle toxique dans la maladie d'Alzheimer c'est avec la théorie de la cascade amyloïde, théorie émise pour la première fois par Wong et collaborateurs (Wong, Quaranta et al. 1985) qui suggérait que l'accumulation anormale de peptide A β conduisait à la formation de plaques, entraînant une neurodégénérescence. Puis cette théorie fut affinée en précisant que la formation des plaques amyloïdes conduisait à la maladie d'Alzheimer ainsi qu'à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires, composés de la protéine tau (Hardy and Higgins 1992). Comme expliqué

précédemment, la pathologie A β commence lorsqu'un certain nombre de mécanismes de régulation d'APP sont perturbés. Par exemple, la voie non amyloïdogène qui, normalement, est la voie principale dans le métabolisme d'APP, se voit remplacer par la voie amyloïdogène. De plus, les processus permettant de dégrader l'APP libéré deviennent non fonctionnels ou moins efficaces, ce qui entraîne une forte augmentation du niveau d'A β , qui *in fine*, se regroupent dans le milieu extracellulaire afin de former les plaques séniles encore appelées plaques neuritiques (Zhang, Thompson et al. 2011).

Le mécanisme menant à la formation de plaques, est dû au fait que les monomères solubles A β peuvent être mal repliés ce qui entraîne leurs regroupements en oligomères solubles puis en filaments et enfin en fibrilles insolubles qui se caractérisent par le croisement des feuillettes β antiparallèles entre deux filaments (Soto 2003, Lee and Ham 2011). Enfin la forme finale d'A β agrégé est la plaque amyloïde qui représente un mélange de plusieurs formes variées d'agrégats. Bien que les deux monomères A β (A β 1-40 et A β 1-42) présentent les mêmes caractéristiques d'agrégation, il semblerait que l'ajout des acides aminés supplémentaires d'A β 42 augmenterait son extrémité C-terminale hydrophobe et par conséquent son niveau d'agrégation (Bitan, Kirkitadze et al. 2003). De plus, la capacité des fragments A β à s'agréger serait imputée à un site clé de 6 acides aminés jouant un rôle de fermeture éclair permettant la dimérisation des monomères (Figure 4) (Arai, Sasaki et al. 2014, Rajasekhar, Suresh et al. 2015).



T. Mohamed et col, 2016, European Journal Of Medicinal Chemistry

Figure 4. – Représentation schématique du processus d’agrégation du peptide Aβ ainsi que de l’hexapeptide permettant sa dimérisation.

Légende : Les monomères solubles d’Aβ vont tout d’abord se dimériser afin de former des oligomères. Puis ces derniers vont s’organiser en filaments qui à leurs tours iront s’assembler de tel sorte à ce que leurs feuillets β soient antiparallèles l’un par rapport à l’autre afin de constituer les fibrilles insolubles. L’hexapeptide au niveau des peptides Aβ aurait un rôle clé dans leurs aptitudes à s’agréger, jouant le rôle de fermeture éclair.

Il existe de nombreux effets pathologiques attribués au peptide Aβ dans la maladie d’Alzheimer. Que ce soit sous forme soluble ou encore sous forme de plaque, Aβ induirait une toxicité importante même si, de nos jours, on suggère à travers l’hypothèse de la cascade des oligomères, que ces derniers auraient un rôle majeur dans la pathologie, comparé aux plaques séniles et déclencherait la maladie (Hayden and Teplow 2013).

L'un des mécanismes néfastes engendré par A β est le stress oxydatif (Bush 2003). En effet, cette hypothèse a été suggérée puisque le peptide A β a une activité rédox avec des métaux tels que le fer ou le cuivre (Rajasekhar, Chakrabarti et al. 2015). Il a été montré que des ions cuivre formaient des complexes avec A β et que ces complexes se retrouvaient dans les plaques amyloïdes. En fait, A β a cette capacité de réduire le cuivre et le fer, et ces ions réduits peuvent interagir avec de l'oxygène afin de produire du peroxyde d'hydrogène et plus tard des radicaux libres (HO) (Butterfield, Swomley et al. 2013). Ces radicaux libres sont impliqués dans la peroxydation des lipides et protéines qui conduira à la mort neuronale.

L'A β induit aussi une perte synaptique même si le mécanisme expliquant comment il le fait reste mal compris. À savoir que ce sont les oligomères A β et non pas les plaques qui seraient responsables de cela. En effet, les oligomères iraient se fixer sur les récepteurs aux niveaux de la fente synaptique et ainsi perturber leurs bons fonctionnements induisant ainsi une perte synaptique qui se traduirait par des déclin cognitifs (Tu, Okamoto et al. 2014). Les récepteurs en question ont été identifiés et il s'agit des NMDA (pour *N-méthyl-D-aspartate receptor*) ainsi que les AMPA (pour *α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic receptor*), récepteurs impliqués dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la formation de la mémoire (Shankar and Walsh 2009). Enfin, l'A β a une haute affinité de liaison pour de nombreux récepteurs notamment les α 7-nicotiniques, ce qui va permettre son internalisation dans les neurones (Ni, Marutle et al. 2013).

Par ailleurs, les agrégats A β interagissent aussi avec la membrane cellulaire (Zhao, Long et al. 2012), formant des pores dans celle-ci, laissant entrer et sortir des flux anormaux d'ions, conduisant à la mort de la cellule (Kawahara and Kuroda 2000). En effet, les ions calcium se trouvant au niveau extracellulaire peuvent facilement entrer dans la cellule par l'intermédiaire de ces pores, perturbant ainsi les mécanismes cellulaires et générant de lourds dommages fatals pour la cellule.

En outre, de récentes études ont montré que le raccourcissement des télomères aurait un rôle à jouer dans la maladie d'Alzheimer. En effet, A β sous forme d'agrégat inhiberait l'activité de la télomérase (*in vivo* et *in vitro*), l'enzyme responsable de l'ajout d'ADN (pour acide

désoxyribonucléique) en 3' dans la région des télomères. De plus, les oligomères quant à eux, se lieraient au complexe formé de la télomérase et de la séquence d'ADN, bloquant ainsi l'élongation du télomère (Wang, Zhao et al. 2015).

Pour finir, chez les patients AD, une partie des pertes neuronales proviendrait de l'apoptose, à savoir la mort programmée de la cellule. Certaines études suggèrent qu'A β activerait NF- κ B/I κ B α , conduisant à la diminution de l'expression d'une sous unité du cytochrome c, aboutissant au dysfonctionnement des mitochondries ce qui déclencherait l'apoptose (Hedskog, Zhang et al. 2012, Shi, Zhu et al. 2014), mais le mécanisme n'est pas encore totalement compris.

De plus, A β amènerait aussi à la production de ROS (pour *reactive oxydative species*) par l'intermédiaire d'AIP1, une protéine de signal de l'apoptose (Wang, Fan et al. 2015). Pour conclure, tous ces résultats montrent qu'A β a un rôle majeur dans la dégénérescence des neurones observée chez les patients atteints d'Alzheimer.

Toutefois, de nombreuses incohérences dans l'hypothèse de la cascade amyloïde suggèrent que la maladie d'Alzheimer n'est sans doute pas monocausale. En effet, pour tester l'hypothèse de la cascade amyloïde, il a été suggéré que si on ajoutait de l'A β dans des cerveaux de patients sains, ils développeraient Alzheimer, ou alors si on enlevait les plaques amyloïdes, les patients atteints de cette maladie ne devraient plus l'être. On a alors testé cette hypothèse chez la souris et l'humain.

Chez l'homme tout d'abord, en utilisant un PET scan (pour *positron emission topography*) sur des cerveaux de patients sains, on a pu observer la présence de dépôts amyloïdes sans ou avec très peu de déficits cognitifs (Klunk, Mathis et al. 2009) (Villemagne, Pike et al. 2011). De plus, ces personnes ne sont pas rares car elles représentent 1/4 voir 1/3 des personnes âgées avec une fonction cognitive normale ou presque normale. Par ailleurs, la présence de dépôts amyloïdes par PET scan augmente de 4 fois le risque qu'une personne en bonne santé ou ayant un léger déclin cognitif puisse développer Alzheimer (Chen, Li et al. 2014). Toutefois la question de savoir combien de temps pouvons-nous vivre avec des plaques amyloïdes sans avoir de symptômes reste à élucider. Néanmoins, il a déjà été montré que cela se compte en années plutôt qu'en semaines (Villemagne, Burnham et al. 2013).

La situation dans les modèles animaux est encore plus préoccupante. En effet, chez des souris transgéniques exprimant l'APP humain (LaFerla and Green 2012) (Webster, Bachstetter et al. 2014), on s'apercevait que même si ces dernières produisaient des dépôts amyloïdes dans leurs cerveaux, elles montraient de modestes symptômes cognitifs, l'absence de NFTs pourtant caractéristiques dans l'Alzheimer (Kitazawa, Medeiros et al. 2012), ainsi qu'une perte synaptique accompagnée de peu voire pas de neurodégénérescence (Hock and Lamb 2001).

Le second moyen de tester l'hypothèse de la cascade amyloïde est de retirer les plaques amyloïdes, ce qui normalement devrait arrêter le déclin cognitif. Chez la souris tout d'abord, en utilisant plusieurs techniques pour supprimer les plaques amyloïdes (par exemple l'immunothérapie) ou encore réduire l'inflammation, on pouvait observer une amélioration des fonctions cognitives presque similaires aux souris contrôles (Cramer, Cirrito et al. 2012) (Schenk, Barbour et al. 1999). Néanmoins, même si de prime abord ces résultats semblent corroborer l'hypothèse de la cascade amyloïde, il faut tenir compte de plusieurs facteurs. Premièrement, chez la souris, la mise en place de traitements capables d'éliminer jusqu'à 100% des plaques n'est pas représentatif de ce qui est fait chez l'humain. En effet, il ne faut pas oublier que les souris Alzheimer, ont certes des problèmes cognitifs comme chez l'humain, mais ces problèmes sont réversibles (Dodart, Bales et al. 2002) (Janus, Pearson et al. 2000) soulignant le fait que ces modèles miment un stade précoce de la maladie mais ne sont pas capable de reproduire un cerveau malade dans un stade plus avancé, avec des déficits permanents et irréversibles.

De plus, chez l'humain, suite au succès de l'immunothérapie chez des modèles murins, des essais cliniques ont vu le jour en espérant améliorer les symptômes des patients en éliminant A β (Orgogozo, Gilman et al. 2003). Malheureusement, des effets secondaires ont entraîné l'arrêt de l'essai. De plus même si certain patient montrait aussi une réduction du nombre de plaque amyloïde (Serrano-Pozo, William et al. 2010), leurs démences ne s'étaient pas améliorées, pire elles continuaient à s'aggraver (Holmes, Boche et al. 2008).

En conclusion, pour expliquer cette différence entre les résultats chez la souris et chez l'humain, il faut se rappeler que les souris ne sont que des modèles artificiels pour reproduire une maladie humaine, car ces dernières ne développent pas naturellement l'Alzheimer. En d'autres

termes, on ne peut pas reproduire une maladie humaine simplement en ajoutant dans un cerveau de mammifère des dépôts amyloïdes. Par ailleurs, la toxicité d'A β est quant à elle bien réelle (Whalen, Selkoe et al. 2005) (Shankar, Li et al. 2008), mais les données suggèrent qu'A β n'est pas suffisant pour déclencher la pathologie, et donc que d'autres acteurs interviennent, tel que la protéine tau.

2.2 La Protéine Tau

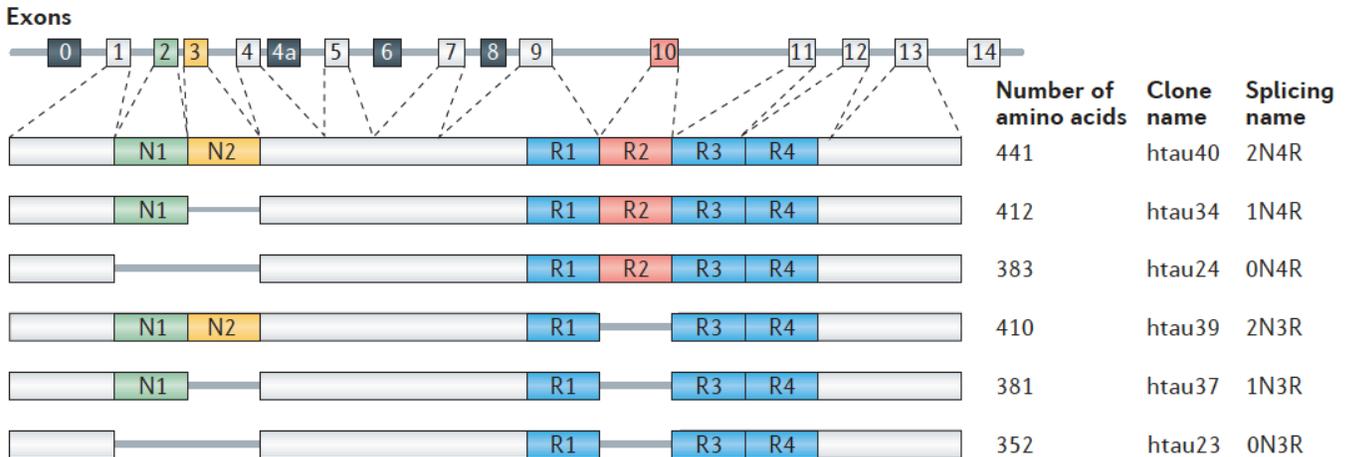
2.2.1 En Condition Physiologique

2.2.1.1 Structure

La protéine Tau, découverte pour la première fois en 1975 (Weingarten, Lockwood et al. 1975), est encodée chez l'humain par le gène *MAPT* (pour *Microtubule Associated-Protein Tau gene*) situé sur le long bras du chromosome 17. Ce gène, une fois transcrit puis traduit, va donner place à une protéine qui, au départ, est encodée par 16 exons (Andreadis 2006). Chez l'adulte, la protéine existe sous 6 isoformes possibles (Figure 5), conséquences de l'épissage alternatif au niveau de trois exons en particuliers : l'exon 2, 3 et 10 (E2, E3 et E10). Le nom donné à ces isoformes dépend de deux caractéristiques : le nombre d'inserts au niveau N-terminal et le nombre de domaines de répétitions au niveau C-terminal. Pour ce qui est de la partie N-terminale, la protéine tau peut contenir 0, 1 ou 2 inserts (0N, 1N ou 2N respectivement) composés de 29 résidus encodés par l'exon 2 et 3. Pour la partie C-terminale en revanche, tau peut alors présenter 3 ou 4 domaines de répétitions (3R et 4R respectivement), sachant que le deuxième domaine de répétition est encodé par l'exon 10 et ne se trouve que dans l'isoforme 4R (Lee, Cowan et al. 1988). Il est à noter que chez l'adulte, les formes 3R et 4R ont un niveau d'expression similaire alors qu'à l'état fœtal, seule l'isoforme 3R est exprimée. Enfin, les isoformes 2N sont sous représentées contrairement aux deux autres : 37% pour la 0N, 54% pour la 1N et 9% pour la 2N (Goedert and Jakes 1990, Wang and Mandelkow 2016). Les domaines de répétitions permettent à la protéine tau de se lier aux microtubules (MT) : ils forment ce que l'on appelle le domaine de liaison aux microtubules. Sachant que la tau 4R possède un domaine de répétition supplémentaire (R2), il a été montré que cela lui permettait d'avoir une meilleure affinité avec les MTs que la tau 3R (Goedert and Jakes 1990). Par ailleurs, la fonction des inserts au niveau N-

terminal reste encore incertaine. Formant le domaine de projection de la protéine avec la région riche en proline, ils peuvent ainsi influencer l'attachement ou l'espacement entre les microtubules et les autres composants de la cellule (Chen, Kanai et al. 1992) (Frappier, Georgieff et al. 1994). Enfin, la protéine tau est très hydrophile (hautement soluble dans l'eau), et comprend une importante asymétrie des charges dans sa composition, à savoir un domaine plutôt acide au niveau N-terminal, alors que plutôt neutre en C-terminal. Cette asymétrie est essentielle lors de ses interactions avec les microtubules notamment, de repliements internes ainsi que la formation d'agrégats (Wang and Mandelkow 2016).

Pour conclure, la protéine tau peut être divisée en deux principaux domaines : Le domaine d'assemblage C-terminal, et le domaine de projection N-terminal. Ces derniers sont reliés entre eux par la région riche en proline composée de 7 motifs PXXP qui servent de point d'ancrage pour des protéines de signalisation tel que la tyrosine kinase Fyn (Lee, Newman et al. 1998). Par ailleurs l'interaction entre cette kinase et tau aurait un rôle important dans l'excito-toxicité générée par A β (Ittner, Ke et al. 2010).



Mandelkow E et col, 2016, Nature Reviews Neuroscience

Figure 5. – Représentation schématique des six isoformes de la protéine tau chez l'humain.

Légende : La protéine tau est composée de six isoformes de tailles comprises en 352 et 441 acides aminés. Ces isoformes diffèrent soit par leurs nombres d'inserts au niveau de la région N-terminale, soit par leurs nombres de domaines de répétitions au niveau C-terminal.

2.2.1.2 Localisation

En condition physiologique, la protéine tau dans le cerveau humain se retrouve majoritairement exprimée dans les neurones, et, dans une moindre mesure, au niveau des oligodendrocytes et des astrocytes (Muller, Heinrich et al. 1997) (Papasozomenos and Binder 1987). De plus, la répartition de la tau est polarisée, c'est-à-dire qu'elle se retrouve beaucoup plus au niveau de l'axone des neurones (Morris, Maeda et al. 2011) que vers le compartiment somato-dendritique (Tashiro, Hasegawa et al. 1997), incluant entre-autre, la membrane plasmique, le noyau, les synapses ainsi que les mitochondries (Li, Hu et al. 2016). Pour expliquer cette répartition hétérogène de la protéine, de nombreuses hypothèses ont été émises et par conséquent divers mécanismes impliqués. Tout d'abord, son ARN messenger (ARNm pour acide ribonucléique messenger) possède en 3', une séquence signal spécifique au compartiment axonal (Aronov, Aranda et al. 2001). De plus, lorsque l'ARNm se retrouve dans l'axone, une kinase impliquée dans la voie mTOR-p70S6 K reconnaît une séquence en 5' (Morita and Sobue 2009) permettant une régulation à la hausse de la tau. Par la suite la protéine tau une fois traduite, va être relâchée vers l'axone du neurone soit par diffusion passive soit à l'aide de protéines de transports telles que les kinésines (Konzack, Thies et al. 2007) (Utton, Connell et al. 2002) (Utton, Noble et al. 2005). Enfin, la protéine tau restera au niveau de l'axone car deux moyens sont en place pour l'empêcher de revenir vers le soma du neurone. Le premier est le maintien d'un niveau de phosphorylation de la tau relativement faible, facilitant grandement son attachement sur les microtubules. Le second moyen est le segment initial de l'axone formant une barrière empêchant ainsi la tau de faire des mouvements rétrogrades et donc de retourner vers le soma (Li, Kumar et al. 2011).

2.2.1.3 Fonctions

Au niveau de l'axone

La protéine tau grâce à ses domaines de liaisons aux microtubules, peut se lier avec ces derniers afin de les stabiliser d'une part, et d'autre part de promouvoir leurs assemblages en particulier en modulant leurs instabilités afin de réguler leurs dynamiques et ainsi permettre le réarrangement du cytosquelette (Feinstein and Wilson 2005) (Mandelkow and Mandelkow 2012). De plus, les microtubules sont formés d'hétérodimères composés d' α et de β -tubuline. La tau

quant à elle, se lie aux MTs par l'intermédiaire de ces dimères au niveau de résidus bien précis alors que le reste des résidus se situant entre les sites de liaisons aux MTs restent eux, flexibles (Kadavath, Hofele et al. 2015). Lorsque la protéine tau s'associe aux MTs, elle prend la conformation d'une structure en épingle (de façon localisée) grâce à certain nombre de ces résidus contenant les 2 hexapeptides (VQIINK et VQIVYK) nécessaires pour que la tau s'agrège (Kadavath, Hofele et al. 2015). Cela suggère donc que lorsque la tau se lie aux microtubules et prend cette conformation particulière, ça l'empêche de s'agréger.

Par ailleurs, la protéine tau joue aussi un rôle dans la régulation du transport axonal. En effet, elle peut influencer les protéines motrices à savoir les dynéines et kinésines qui ont pour rôle de transporter des cargos vers l'extrémité – (vers le soma) et + (vers l'axone) des microtubules respectivement (Stamer, Vogel et al. 2002). Effectivement, tau va entrer en compétition avec les protéines motrices pour s'attacher aux microtubules, diminuant ainsi leurs fréquences de liaison, ralentissant par la même occasion les transports antérogrades et rétrogrades (Dixit, Ross et al. 2008). De plus, la protéine tau est capable de réduire le nombre de protéines motrices interagissant avec les cargos perturbant ainsi le transport axonal (Vershinin, Carter et al. 2007). De même, étant elle-même un cargo sur les microtubules, la tau rentre en compétition avec les autres cargos et affecte là encore le transport axonal (Konzack, Thies et al. 2007) (Utton, Noble et al. 2005). Par ailleurs, elle peut aussi influencer le relargage par vésicules des autres cargos en activant GSK3 β (pour glycogène synthase kinase 3 β) et PP1 par l'intermédiaire de résidus situés sur son extrémité N-terminale (Kanaan, Morfini et al. 2011). En outre, tau a la capacité de se lier à une sous unité de la dynactine, facilitant ainsi l'interaction entre cette dernière et les microtubules, ce qui aura pour conséquence d'améliorer le transport par dynéine (Magnani, Fan et al. 2007). Toutefois, bien que ces nombreuses évidences suggèrent que la tau a un rôle majeur dans le transport axonal, toutes ces études ont été faites *in vitro*, or dans des modèles de souris, lorsqu'on surexprimait la tau, il n'y avait qu'une légère différence dans le transport axonal, suggérant ainsi *qu'in vivo* il existerait des mécanismes pour contre balancer l'effet de la tau sur le transport au niveau de l'axone (Yuan, Kumar et al. 2008).

Pour finir, la tau aurait aussi un rôle à jouer dans l'élongation et la maturation de l'axone comme le suggère des articles utilisant des modèles KD (knockdown) de tau dans des cellules

neuronales de rats, ayant pour effet d'inhiber la formation de neurites (Caceres and Kosik 1990) alors qu'une surexpression de tau induisait la formation de neurites même dans des cellules non neuronales à la base (Knops, Kosik et al. 1991).

Au niveau des dendrites

En condition physiologique, une faible quantité de tau se retrouve au niveau des dendrites des neurones. D'autres études suggèrent qu'elle pourrait même se localiser au niveau des épines dendritiques (Ittner, Ke et al. 2010) mais cela reste encore à prouver étant donné que l'étude en question se base principalement sur des préparations de synaptosomes (c'est-à-dire un terminal synaptique isolé d'un neurone obtenu après centrifugation), et qu'en découle des incertitudes intrinsèques sujettes à interprétation (Tai, Wang et al. 2014) (Mondragon-Rodriguez, Trillaud-Doppia et al. 2012). De plus, la fonction de la tau dans ce compartiment reste encore mal connue. Une étude montre qu'en activant pharmacologiquement l'activité synaptique d'un neurone de souris, on observait le recrutement de la tau depuis les épines dendritique vers l'élément exciteur post-synaptique, suggérant ainsi que la tau aurait un rôle dans la plasticité synaptique (Frandemiche, De Seranno et al. 2014).

Au niveau du noyau

Que ce soit en condition physiologique ou lors de stress thermique (Violet, Delattre et al. 2014), des études ont montré que la tau se retrouvait au niveau du noyau, dans des cellules neuronales ou non neuronales (des cellules humaines fibroblastiques) (Loomis, Howard et al. 1990) (Sjoberg, Shestakova et al. 2006). En effet, la tau aurait un rôle dans le maintien et l'intégrité de l'ADN, l'ARN cytosolique ou encore l'ARN nucléaire (Sultan, Nessler et al. 2011). De plus, dans la maladie d'Huntington et Alzheimer, on retrouve des agrégats de tau en forme de bâton dans les noyaux de neurones (Fernandez-Nogales, Cabrera et al. 2014). Toutefois, les effets de ces agrégats de tau ne sont pas encore totalement clairs et il faudra des études complémentaires pour affirmer leurs rôles.

Les autres fonctions

La protéine tau semblerait avoir un rôle dans la régulation de l'activité neuronale. En effet, des modèles de souris ayant des déficiences génétiques de la protéine tau auraient une protection contre l'excitotoxicité causée par A β (Roberson, Scearce-Levie et al. 2007) (Ittner, Ke et al. 2010). De plus, dans des modèles de souris développant des crises épileptiques, il a été montré que si on réduisait l'expression de la protéine tau à l'aide d'un oligonucléotide antisens, on pouvait supprimer ces crises (DeVos, Goncharoff et al. 2013). Cela montre en effet que la tau aurait un rôle dans l'activité neuronale en condition pathologique mais sa fonction en condition normale reste encore à explorer.

Par ailleurs, la tau posséderait une fonction dans la neurogénèse mais cela reste encore à prouver. En effet, dans une lignée de souris KO (pour *knock out*) pour la tau, on pouvait observer une grande perturbation de la neurogénèse au niveau de l'hippocampe dans un cerveau adulte de souris (Hong, Peng et al. 2010). Cela reste encore sujet à controverse puisque dans d'autres lignées de souris KO, on n'observait pas cette réduction-là. Au lieu de cela, on pouvait voir une diminution importante de la migration des jeunes neurones vers la zone granulaire de l'hippocampe (Fuster-Matanzo, de Barreda et al. 2009).

Une autre fonction attribuée à la tau serait sa capacité à réguler le trafic d'ions ferreux intra-neuronal. Effectivement, on a pu observer chez des souris KO tau, une accumulation importante de fer à l'intérieur des neurones induisant une perte neuronale dans la substance noire (*substantia nigra*) ainsi qu'un sévère déficit moteur (Lei, Ayton et al. 2012). Cela s'expliquerait de fait que la tau lorsqu'elle est soluble, permettrait à APP de migrer vers la surface cellulaire afin d'interagir avec une ferroportine (FPN), protéine permettant d'expulser le fer hors de la cellule. De plus, une telle accumulation de fer intra-neuronale a été observée dans des régions cérébrales où la tau serait faiblement soluble (donc fortement agrégée), à savoir dans la substance noire chez des patients atteints de Parkinson, ou bien au niveau du cortex chez des patients MA.

Comme évoqué précédemment, la protéine tau serait impliquée dans la plasticité synaptique. En effet, dans des souris KO tau, on pouvait observer un déficit spécifique *in vivo* et *ex vivo* (Kimura, Whitcomb et al. 2014) soit de la DLT (pour dépression à long-terme) mais pas de la PLT (pour potentialisation à long-terme) ou l'inverse (Ahmed, Van der Jeugd et al. 2014) selon l'étude que l'on suit. La différence entre les deux études serait probablement due à plusieurs facteurs, tel que l'âge des souris, la lignée utilisée ainsi que la technique d'induction de la DLT.

De plus, la protéine tau aurait également un effet sur le fonctionnement ainsi que le transport mitochondrial (Cheng and Bai 2018). En effet, les mitochondries ont besoin de certains cargos qui sont transportés le long des microtubules par des protéines telles que la tau. Or, il a été montré qu'une hyperphosphorylation de la protéine tau provoquerait une délocalisation des mitochondries ainsi qu'une réduction de leur nombre, entraînant par la même occasion une perturbation axonal et un déficit synaptique (Shahpasand, Uemura et al. 2012) (Rodriguez-Martin, Cuchillo-Ibanez et al. 2013). En effet, une phosphorylation excessive notamment sur des sites particuliers de la tau tels que AT8 (Ser202, Thr205), inhiberait le mouvement des mitochondries et affecterait leurs distributions le long de l'axone, dans des cerveaux de souris (Shahpasand, Uemura et al. 2012). Par ailleurs, le dysfonctionnement mitochondrial jouerait un rôle primordial dans la maladie d'Alzheimer. En fait, on peut observer une perturbation mitochondriale par de nombreux indicateurs dans la maladie, tels que la diminution de la synthèse d'ATP et l'augmentation de la production de ROS notamment (Cabezas-Opazo, Vergara-Pulgar et al. 2015). De plus, certain modèle de souris Alzheimer présente des problèmes cognitifs avant l'apparition des NFTs, suggérant que la perturbation mitochondriale par la protéine tau serait un des symptômes les plus précoces dans la maladie.

Pour finir, la tau interagirait avec des éléments du cytosquelette autres que les microtubules. Effectivement, la protéine lorsqu'elle interfère avec l'actine, induit des faisceaux alignés modifiant ainsi l'organisation du cytosquelette. De plus lorsque la tau est phosphorylée, elle interagit avec l'actine par l'intermédiaire de ses motifs KXGS, et co-localise avec ces filaments dans les cônes de croissance lors du développement et dans les inclusions actine-cofiline en forme de bâtonnet (Biernat, Wu et al. 2002) (Whiteman, Gervasio et al. 2009).

2.2.1.4 La Phosphorylation de la Tau

La protéine tau a de nombreuses modifications post-traductionnelles, mais la plus connue est la phosphorylation à cause de la découverte de la protéine tau hyperphosphorylée dans la maladie d'Alzheimer. Cette protéine est l'une de celle possédant le plus de sites phosphorylables, avec, pour sa plus grande isoforme à savoir 2N4R, pas moins de 85 sites phosphorylables (45 sérines Ser, 35 thréonines Thr, 5 tyrosines Tyr) (Martin, Latypova et al. 2011) (Mietelska-Porowska, Wasik et al. 2014). Les protéines responsables de la phosphorylation de tau peuvent être regroupées en trois catégories distinctes : (1) les kinases phosphorylant les sérines et thréonines se situant à côté d'une proline (Pro) ; incluant GSK-3 β , Cdk5 (pour *cycline dependent kinase*) et MAPK (pour *mitogen activated protein kinase*), (2) les kinases phosphorylant les sérines et thréonines ne se situant pas directement à côté d'une proline ; tel que PKC (pour *protein kinase c*), CaMKII (pour *calmodulin dependent protein kinase II*) et AMPK (pour *AMP activated protein kinase*), (3) et enfin les tyrosine kinases telles que Fyn (Tapia-Rojas, Cabezas-Opazo et al. 2019). Bien qu'il soit vrai de dire que la phosphorylation excessive de cette protéine conduit à sa toxicité, 31 sites de phosphorylation ont été identifiés pour contribuer à la fonction normale de la protéine (Hasegawa, Smith et al. 1998) (Lovestone and Reynolds 1997) (Morishima-Kawashima, Hasegawa et al. 1995). De plus, la phosphorylation de tau est régulée lors du développement, puisque chez le fœtus, la tau porte environ 7 phosphates par molécule, ce qui est bien plus élevée que chez l'adulte avec environ 2 phosphates par molécule (Kanemaru, Takio et al. 1992), mais aussi proche de ce que l'on retrouve chez des patients Alzheimer avec environ 8 phosphates par molécule (Kopke, Tung et al. 1993). Par ailleurs, la phosphorylation de tau lui permet de moduler son affinité avec les microtubules, puisqu'une phosphorylation sur des sites précis diminue son affinité de liaison avec ces derniers (Buee, Bussiere et al. 2000), ce qui aura pour conséquence d'améliorer leurs dynamiques et donc de mener aux développements neuronaux ainsi qu'à la polarité cellulaire (Biernat, Wu et al. 2002). Enfin, la tau, suivant son degré de phosphorylation, peut voir sa localisation changer entre la membrane plasmique (Pooler, Usardi et al. 2012), le noyau (Sultan, Nesslany et al. 2011) ou encore les vésicules exocytotiques (Tang, Iloja et al. 2015). En outre, une phosphorylation aux niveaux des sérines 262 et 356, sites se trouvant dans les domaines de liaison aux microtubules, est nécessaire pour la cellule alors qu'une phosphorylation

dans la région proximale des domaines de liaison aux microtubules bloque le développement des neurites (Biernat and Mandelkow 1999).

2.2.2 En Condition Pathologique

2.2.2.1 La Théorie de l'Hyperphosphorylation de Tau

Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine tau subit de nombreuses altérations changeant sa fonction physiologique et entraînant une toxicité dans les cellules.

La première chose qui fut mise en lumière, est que la protéine tau semble hyperphosphorylée (hyperP) sur beaucoup de ses sites (Mandelkow, Biernat et al. 1995) (Trojanowski and Lee 1995). De plus, la majorité de ces sites sont soit des sérines soit des thréonines. Cela a pu être identifié par la mise au point d'anticorps (AT8) dirigés contre la tau humaine, capables de reconnaître des épitopes phosphorylés. Ces anticorps sont encore aujourd'hui utilisés dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (Mandelkow and Mandelkow 1998). Enfin, suite à ces nombreux diagnostics ainsi qu'aux modèles de souris, il a été montré que la phosphorylation excessive de la protéine tau, survenait avant l'agrégation de celle-ci (Braak, Braak et al. 1994). Enfin l'évidence du rôle toxique de cette hyperphosphorylation a aussi été mis en évidence par le fait qu'il existe un groupe de protéine phosphatases qui sont impliquées dans la déphosphorylation de la tau (Hanger, Anderton et al. 2009). Parmi elles, se trouve la PP2A (pour protéine phosphatase 2A) qui est en condition normale, la principale phosphatase de tau. Or, dans la MA, son activité est réduite de 20 et 40% dans la matière grise et blanche respectivement (Gong, Singh et al. 1993). Cette diminution d'activité dans la MA peut s'expliquer par l'augmentation d'inhibiteurs PP2A, ou la diminution de son expression (Chen, Li et al. 2008). Par ailleurs, les kinases et phosphatases voient leurs activités diminuer selon la température, mais cette diminution est exponentielle pour les phosphatases alors qu'elle n'est que linéaire pour les kinases (Planel, Miyasaka et al. 2004). Cela expliquerait le fait que chez des animaux en hibernation, on retrouvait une tau hyperphosphorylée (Arendt, Stieler et al. 2003) (Planel, Richter et al. 2007).

Deuxièmement, dans la pathologie d'Alzheimer, la tau perd grandement de son affinité avec les microtubules suite à la phosphorylation de certain de ses sites, comme par exemple S262

ou S214 (Pei, An et al. 2006). Ces ajouts répétés de phosphates sur la protéine l'empêchent d'interagir correctement avec les microtubules, la faisant se détacher de ces derniers, causant par la même occasion, une perturbation importante du trafic intracellulaire, menant à la dégénérescence de l'axone, encore appelée Wallerian dégénérescence.

Troisièmement, la protéine tau qui en temps normal est principalement le long de l'axone, se retrouve au niveau du compartiment somato-dendritique du neurone. Cette relocalisation de la protéine a des conséquences néfastes sur la plasticité synaptique (Franscomi, De Seranno et al. 2014). De plus, il a été montré que l'accumulation d'une tau hyperphosphorylée dans le compartiment somato-dendritique était possible lorsque des neurones étaient exposés à des oligomères A β (Zempel, Thies et al. 2010).

Quatrièmement, la protéine tau, une fois hyperphosphorylée, peut facilement s'agréger et ainsi former ce que l'on appelle des PHF (pour *paired helical filaments*) en raison de leurs aspects à deux bras (Mandelkow and Mandelkow 1998) (Calderon-Garciduenas and Duyckaerts 2017). Les PHF se regroupent alors en enchevêtrements neurofibrillaires (NFT) (Brion, Couck et al. 1985) dans le corps cellulaire du neurone ou en filaments du neuropile quand ils se trouvent au niveau des dendrites (Braak and Braak 1988)

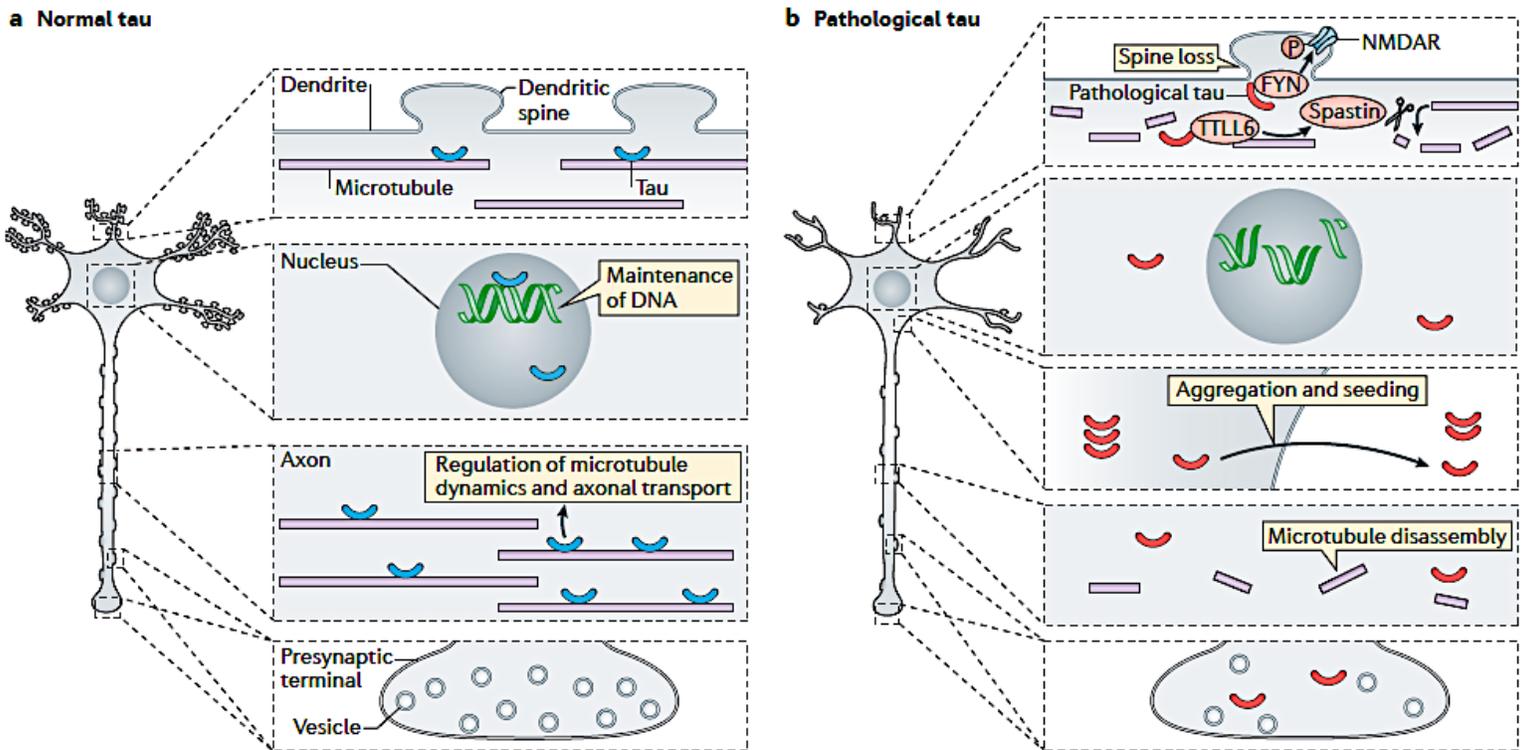
Toutes ces observations ont été regroupées dans une hypothèse expliquant le rôle de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer. Cette hypothèse suggère que suite à l'hyperphosphorylation de tau induite par le changement d'équilibre entre les kinases et phosphatases, la tau va perdre son affinité avec les microtubules, se détacher d'eux induisant ainsi leurs désassemblages. Par la suite, tau va alors migrer vers le compartiment somato-dendritique pour s'y agréger et former les NFTs et ainsi provoquer la dégénérescence des neurones (Mandelkow and Mandelkow 1998).

2.2.2.2 La Toxicité de la Tau Hyperphosphorylée

Comme décrit précédemment, dans des conditions pathologiques, la protéine tau va subir des modifications post-traductionnelles tel que l'acétylation, l'ubiquitylation ou encore l'hyperphosphorylation. Il a été montré que dans des cerveaux de souris, lorsqu'on injectait de la tau, on pouvait voir que les plaques A β facilitaient son agrégation (He, Guo et al. 2018). De plus,

Braak avait décrit une progression stéréotypée des NFTs dans le cerveau de plusieurs patients Alzheimer, à savoir que la tau commençait au niveau de la région entorhinale, puis continuait vers l'hippocampe pour finir au niveau du néocortex (Braak and Braak 1991). Des années plus tard, par PET (*positron emission tomography*), des chercheurs ont pu suivre la propagation de la tau qui corrélait avec le déclin cognitif de ces patients, contrairement à A β (Scholl, Lockhart et al. 2016) (Marquie, Siao Tick Chong et al. 2017). Par ailleurs, il a alors été montré que lorsque la tau était hyperP, elle perdait notamment sa capacité à se lier avec les microtubules, perturbant ainsi le transport axonal (Figure 6). De plus, une fois détachée, la tau irait se retrouver au niveau présynaptique, induisant un dysfonctionnement qui aura pour conséquence la réduction du nombre de vésicules synaptiques ainsi qu'une perte synaptique (Decker, Kruger et al. 2015). En outre, le tau hyperP qui normalement aurait un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome, ne pourrait plus remplir son rôle correctement (Sultan, Nessler et al. 2011). Toutefois, bien qu'au départ les scientifiques pensaient que la toxicité de la tau venait exclusivement de sa forme agrégée, depuis des études suggèrent qu'elle ne serait pas la cause principale de ses effets néfastes. En effet, des articles sur des modèles animaux de tauopathies *in vivo* montrent que les NFTs n'auraient pas d'impact sur la perte de la mémoire ainsi que de la dégénération neuronale (Berger, Roder et al. 2007). Dans cette optique, il a été identifié des formes solubles de tau (oligomère) qui s'agrégeaient au début de la pathologie et qui eux, conduisaient à la progression de la maladie. De plus Cowan et Mudher ont identifié les différents intermédiaires de tau ainsi que leurs potentielles toxicités (Cowan and Mudher 2013). Cela confirme que les oligomères solubles de tau sont la forme la plus toxique de la protéine et que, lorsqu'ils s'agrègent perdent de leurs virulences.

Figure 6. – Représentation schématique des diverses fonctions de la protéine tau en condition physiologique versus en condition pathologique.



Mandelkow E et col, 2016, Nature Reviews Neuroscience

Légende : En condition physiologique (a), la tau au niveau des dendrites pourrait avoir un rôle dans la plasticité synaptique mais cela reste encore à prouver. Au niveau du noyau, la protéine permet de maintenir l'intégrité du génome. Au niveau de l'axone, tau a un rôle dans la régulation des microtubules ainsi que dans le transport axonal. Enfin, au niveau des synapses, elle aurait un rôle là encore dans la plasticité synaptique en modulant la PLT et/ou DTL.

En condition pathologique (b), la protéine tau peut subir des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation qui diminuerait son affinité avec les microtubules et provoquerait ainsi leurs désassemblages. La tau phosphorylée serait mal localisée et ne se retrouverait donc plus au niveau pré-synaptique entraînant une diminution importante des vésicules et par conséquent une perte synaptique. De plus, la tau, dans sa conformation pathologique, ne pourrait plus revenir au niveau du noyau, ne pouvant plus assumer sa fonction protectrice. En outre, les

agrégats de tau peuvent se retrouver au niveau extracellulaire et ainsi contaminer les neurones aux alentours, permettant ainsi la propagation de la maladie. Pour finir, la tau au niveau dendritique, interagit avec FYN, une kinase qui ira phosphoryler les récepteurs NMDA, stabilisant ainsi l'interaction entre ces récepteurs et la protéine post-synaptique PSD95 (pour post-synaptic density protein 95), permettant d'augmenter l'effet excitotoxique d'Aβ.

2.2.2.3 L'hyperphosphorylation de la Tau est Toxique ?

Cette question peut sembler futile à la vue des nombreuses preuves citées précédemment, pourtant le doute subsiste puisqu'à l'heure actuelle, personne ne peut dire avec certitude que l'hyperphosphorylation de la tau est la cause majeure dans la MA.

À cela s'ajoute des études scientifiques soulevant la possibilité que des neurones peuvent vivre normalement pendant plus de 20 ans avec des NFTs (Morsch, Simon et al. 1999). En effet, les auteurs ont montré que des neurones de l'hippocampe (CA1) avaient des NFTs depuis des décennies. De plus, la perte neuronale était bien supérieure à la quantité de NFTs retrouvée (Gomez-Isla, Hollister et al. 1997) (Kril, Patel et al. 2002). Cela suggèrerait que la formation des NFTs se produirait des années avant le début de la dégénérescence et que par conséquent, la relation entre l'apparition des NFTs et celle des premiers symptômes semble peu probable.

Par ailleurs, il n'y a pas non plus de corrélation entre les signes apoptotiques des neurones (tel que la fragmentation de l'ADN) et les dépôts de protéine tau, montrant là encore que les NFTs n'auraient pas un effet direct avec la mort neuronale (Broe, Shepherd et al. 2001). De même, dans des modèles de drosophiles et de souris transgéniques, on pouvait voir que la tau induisait la mort neuronale en l'absence de filaments (Wittmann, Wszolek et al. 2001) (Probst, Gotz et al. 2000).

Aussi, il a été rapporté dans un modèle de souris transgénique surexprimant une tau mutée (P301L) que lorsqu'on supprimait le transgène, on voyait une amélioration de la mémoire ainsi qu'une stabilisation dans la perte neuronale, et ce même si les NFTs continuaient à s'accumuler (Santacruz, Lewis et al. 2005). Pour finir, la perte neuronale observée dans ces souris était géographiquement dissociée de la localisation des NFTs. Effectivement, la perte des neurones au niveau du gyrus denté se produisait avant l'apparition des NFTs qui elles se

retrouvaient principalement au niveau du striatum où il n'y avait pas de pertes neuronales observées (Spires, Orne et al. 2006). Par ailleurs, des souris ayant une déficience en protéine tau, se développent normalement (Lee, Perry et al. 2005).

De surcroît, le système nerveux de ces souris était normal et des cultures de ces neurones *in vitro* ont révélé qu'ils possédaient un axone normal et que son élongation n'était pas affectée (Harada, Oguchi et al. 1994). Cela mettrait en doute l'hypothèse expliquant que la tau, lorsqu'hyperP, perdrait son affinité avec les microtubules et cela aurait une conséquence dramatique sur les neurones et leurs axones.

D'autres études encore, ont révélé que chez des souris KO pour la tau ou les neurofilaments, le système nerveux n'était pas altéré, soulignant ainsi la possibilité que la formation des NFTs ainsi que le problème d'assemblage des MTs ne seraient pas la cause de la neurodégénérescence dans la MA (Elder, Friedrich et al. 1998) (Rao, Houseweart et al. 1998). En fait, la stabilité des microtubules ne serait même pas dépendante de la phosphorylation de la tau puisqu'il n'y aurait pas de relation apparente entre les filaments de tau et les problèmes des MTs dans les cerveaux Alzheimer (Cash, Aliev et al. 2003).

Outre le fait que les NFTs ne seraient peut-être pas toxiques, il se pourrait même qu'ils soient protecteurs pour le neurone (Castellani, Nunomura et al. 2008). En effet, les dommages liés au stress oxydatif seraient l'un des événements les plus précoces dans la MA et ils diminueraient avec la progression de la maladie et donc avec la formation des NFTs (Nunomura, Perry et al. 2001). Il semblerait donc que les NFTs auraient un rôle anti oxydant face au stress oxydatif comme le suggère certaine étude (Smith, Casadesus et al. 2002). Effectivement, la tau ainsi que les neurofilaments, deux composés majeurs des NFTs (Mulvihill and Perry 1989), sont adaptés à une réponse face au stress oxydatif de par leurs fortes teneurs en domaines KSP (lysine/sérine/proline) (Wataya, Nunomura et al. 2002). Par ailleurs, la phosphorylation de tau est régulée à la hausse lors d'un stress oxydatif (Gomez-Ramos, Diaz-Nido et al. 2003), et la tau ainsi que les neurofilaments sont modifiés suite à ce stress (Takeda, Smith et al. 2000), conduisant à l'agrégation des protéines tel que les NFTs (Perez, Cuadros et al. 2000). Cette phosphorylation induite s'expliquerait par le fait que lors d'un stress oxydatif, certaines kinases impliquées dans la

phosphorylation de tau telles que GSK-3 β ou MAPK sont activées (Zhu, Rottkamp et al. 2000) (Zhu, Raina et al. 2001).

Par ailleurs, des études faites sur des animaux pratiquant l'hibernation sont en faveur d'un rôle bénéfique de l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Zhou, Smith et al. 2001). Par exemple, une étude faite sur une trentaine d'écureuils européens montre que lors de l'hibernation, la tau devient hyperphosphorylée et se regroupe en fibrilles (PHFs) (Arendt, Stieler et al. 2003). De plus lorsque les animaux sortent de leurs états de sommeil, la tau revient à des niveaux plus classiques de phosphorylation, suggérant un processus réversible et naturel. Il a été montré que la phosphorylation excessive de la protéine durant cette période protégerait les neurones contre l'apoptose. En effet, l'hibernation induit une diminution importante de glucose et d'oxygène qui corrèle avec l'augmentation de la phosphorylation de la tau, permettant de protéger les neurones du déficit important de ressources vitales pour eux. Il semblerait donc que lors d'un déficit important en énergie, la phosphorylation excessive de la tau serait un mécanisme biologique permettant aux neurones de se protéger face à ce type de stress.

Enfin, une autre preuve supportant l'hypothèse que la phosphorylation de tau aurait un rôle neuroprotecteur, est une étude sur des neurones embryonnaires, qui, lorsque soumis à un stress oxydatif, auraient en eux plus de tau phosphorylée que ceux n'ayant pas survécus au stress (Lee, Perry et al. 2005).

2.2.2.4 La Tau Hypophosphorylée est Toxique ?

Il est vrai de dire que de nombreuses études montrent que la tau, lorsqu'hyperP, se détache des microtubules et induit une toxicité. Ce qui, en revanche, est moins évident de penser, c'est qu'un sur-attachement de la protéine sur les MTs est tout aussi toxique. Pourtant plusieurs articles scientifiques renforcent cette idée puisque par exemple, en culture cellulaire (*in vitro*), il a déjà été montré qu'un excès de tau lié aux MTs produirait une perturbation du transport axonal, se traduisant par une réduction de mouvements de certains organelles (Ebner, Godemann et al. 1998) (Stamer, Vogel et al. 2002). Cette perturbation axonale serait induite par la tau qui, en se liant aux MTs de façon excessive, obstrue physiquement le passage, empêchant ainsi les molécules motrices (dynéine et kinésines) d'effectuer leurs fonctions (Dixit, Ross et al. 2008)

(Vershinin, Carter et al. 2007). Pour confirmer ces observations *in vitro*, des chercheurs ont mis au point un modèle de drosophile exprimant une tau hypophosphorylée qui se liait fortement aux MTs (Talmat-Amar, Arribat et al. 2011). Les résultats montraient une diminution du nombre de vésicules situées au niveau de l'axone ainsi qu'un ralentissement de ces dernières. Par ailleurs, le mouvement antérograde était fortement perturbé bien plus que le rétrograde, confirmant ce qui avait déjà été observé dans des cellules N2A (Stamer, Vogel et al. 2002), CHO (Trinczek, Ebner et al. 1999) et des neurones primaires de rats. Pour finir, étant donné l'importante perturbation dans le transport le long de l'axone, la tau hypoP aurait par conséquent un rôle dans la relâche des neurohormones au niveau des terminaisons synaptiques. En effet, il a été montré que chez la drosophile, la tau hypoP induisait une perturbation axonale, impliquant par la même occasion un déficit d'une hormone (3-Bursicon) importante pour le développement des ailes (Song 2012).

De plus, il a été montré que la tau hypophosphorylée aurait aussi des effets toxiques dans des modèles de souris P301L. En effet, les souris exprimant une tau hypophosphorylée voyaient une réduction de 50% du nombre de mitochondries présentes sur l'axone des neurones corticaux comparées au contrôle mais sans affecter leur transport rétrograde et antérograde (Rodriguez-Martin, Pooler et al. 2016). De plus, on observait une augmentation du volume de chaque mitochondrie mais sans affecter leur vitesse, pour les souris exprimant une tau hypophosphorylée. Enfin, dans une autre étude, utilisant là encore des souris P301L exprimant un tau hypophosphorylée, on pouvait observer une perturbation dans le transport mitochondriale le long de l'axone ainsi qu'une activité locomotrice augmentée par rapport aux souris contrôles (Gilley, Seereeram et al. 2012). Cela suggère que ce phénotype serait une manifestation pathologique précoce de la toxicité d'une tau hypophosphorylée dans ce modèle de souris.

Étant donné qu'une des stratégies thérapeutiques pour combattre Alzheimer est d'inhiber la phosphorylation de tau, et parce qu'il existe des preuves montrant le potentiel effet délétère d'une tau hypophosphorylée, il serait important de déterminer dans quelle proportion et donc à partir de quel niveau de phosphorylation la protéine tau devient toxique.

2.2.2.5 Les Tauopathies

Le terme tauopathie fut inventé par Bernardino Ghetti et Michel Goedert qui souhaitaient regrouper toutes les maladies neurologiques ayant des inclusions de la protéine tau que ce soit dans les neurones ou dans la glie (Gotz, Halliday et al. 2019). Les tauopathies sont un groupe très hétérogène de pathologies, subdivisé en sous-groupes selon par exemple, l'isoforme de tau formant ces inclusions ou bien encore les régions du cerveau touchées. Par exemple, le groupe nommé FTLD pour *Frontotemporal Lobar Degeneration* englobe les pathologies qui ont des inclusions de tau au niveau des lobes frontal et temporal du cortex. Dans ce groupe, selon l'isoforme de tau prédominante, on peut avoir la maladie de Pick (tau 3R) (Yamazaki, Nakano et al. 1994) alors que pour les tauopathies tau 4R on aura plutôt la PSP (pour *progressive supranuclear palsy*) (Steele, Richardson et al. 1964) ou la CBD (pour *corticobasal degeneration*) (Dickson 1999). De plus, bien que la majorité des FTLD sont des cas sporadiques, environ 40% des patients ont une forme familiale (Hutton, Lendon et al. 1998) (Poorkaj, Bird et al. 1998). Par ailleurs, il est important de souligner que certaines FTLD ont une tau ayant subi des mutations. La première ayant été découverte fut sur le gène MAPT codant pour la tau dans les dégénérescence fronto-temporales avec parkinsonismes (Spillantini, Murrell et al. 1998). À la différence des autres tauopathies, l'Alzheimer a la particularité d'avoir pour origine deux lésions pathologiques à savoir la protéine tau mais aussi le peptide A β (Dubois, Hampel et al. 2016). De plus, les agrégats de tau sont composés à la fois de tau 3R et 4R (Gotz, Halliday et al. 2019). Enfin, seul un faible pourcentage de cas d'Alzheimer a pour cause une mutation (APP, PS1/PS2) mais jamais dans la tau. Pour conclure, il est important de se rappeler que même si l'Alzheimer est l'une des maladies neurodégénératives les plus connues, la protéine tau a un impact bien plus large et induit de nombreuses pathologies qui, bien que différentes à certains niveaux (progression, région du cerveau touchée, symptômes), trouvent un point commun dans la formation d'agrégats de cette protéine.

2.3 L'interaction entre la protéine Tau et le peptide A β dans la Maladie d'Alzheimer

La première évidence montrant le lien entre la protéine tau et le peptide A β fût découverte en 2001, sur des modèles de souris transgéniques de tau humaine (P301L) qui accumulent des enchevêtrements neurofibrillaires (Gotz, Chen et al. 2001). En effet, ces souris présentaient une accumulation de tau agrégée causant une tauopathie non Alzheimer à savoir la démence frontotemporal avec parkinsonisme-17. Par ailleurs, après avoir injecté des fibrilles d'A β , la formation d'agrégats de tau était accélérée montrant une interaction essentielle entre ses deux protéines (Bloom 2014).

De plus, en 2007, un autre groupe de chercheur montra dans un modèle de souris A β , que la tau était requise pour induire des déficits d'apprentissage et de mémoire (Roberson, Scarce-Levie et al. 2007), suggérant que le peptide A β initierait une voie biologique qui conduirait la protéine tau à induire des perturbations au niveau synaptique.

De plus, en 2010, des résultats ont montré qu'une protéine faisait la connexion entre la protéine tau et A β . Cette protéine se nomme Fyn, une kinase qui régule les récepteurs NMDA au niveau post synaptique (Ittner, Ke et al. 2010). Or dans l'article, on a montré que la protéine tau se lie directement à Fyn, modulant ainsi sa distribution, conduisant à une augmentation de récepteurs NMDA à la surface des neurones. Par ailleurs, il a été montré qu'A β induit son excitotoxicité en activant de façon anormale ces récepteurs, entraînant sur le long terme, la mort des neurones.

Également, les dépôts amyloïdes bêta ont aussi montré leurs capacités à perturber l'assemblage des microtubules dépendamment de la protéine tau dans des cultures de neurones (King, Kan et al. 2006). De plus, les oligomères A β induisent également une inhibition du transport mitochondrial, là aussi dépendant de la tau (Vossel, Zhang et al. 2010).

Enfin, dans un modèle Alzheimer de souris, une autre preuve d'un éventuel lien entre A β et tau a été révélée. En effet, dans ce modèle animal, les chercheurs ont induit une délétion de la protéine tau afin d'observer l'impact que cela aurait sur A β (Peters, Salihoglu et al. 2019). Les

résultats montrent une réduction de plus de 24% des plaques A β chez la souris ayant la délétion de tau comparée au contrôle. Par ailleurs, même en absence de la protéine tau, les plaques A β apparaissent suggérant ainsi que la tau n'est pas nécessaire pour la formation des plaques mais régule à la hausse leurs quantités. À cela s'ajoute le fait que la suppression de la protéine tau provoque une forte réduction (plus de la moitié) de l'accumulation de BACE1 sans affecter son expression physiologique, ce qui aura pour conséquence la décélération de la formation de nouvelles plaques amyloïdes ainsi que la réduction de la compacité de celles-ci. (Peters, Salihoglu et al. 2019).

Pour conclure, il est évident que les deux protéines tau et A β interagissent entre-elles dans la maladie d'Alzheimer, et il est donc primordial de comprendre leur rôle dans la pathologie. De plus, traiter l'une ou l'autre séparément ne sera pas suffisant pour soigner la tauopathie et cela peut expliquer pourquoi plusieurs essais cliniques se focalisant sur l'une ou l'autre protéine ont échoué.

3. Modèle Expérimental : le *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

3.1 Généralités sur le *C. elegans*

C'est dans les années 70 que le *C. elegans* fut pour la première fois utilisé dans le domaine scientifique. En effet, Sydney Brenner voulu étudier les mécanismes liés au développement ainsi qu'au système nerveux et pour cela, il eut l'idée d'utiliser un organisme simpliste nommé *C. elegans* (Corsi, Wightman et al. 2015) (Nigon and Felix 2017). Le *C. elegans* est un nématode de petite taille, que l'on trouve à l'état sauvage partout dans le monde, que ce soit au niveau du sol notamment mais aussi dans les végétaux pourrissants, source importante de bactérie (Barriere and Felix 2014). En effet, ce minuscule ver transparent possède de nombreuses qualités, qui en font un modèle de laboratoire intéressant.

Tout d'abord, par sa petite taille, (1mm à l'âge adulte) qui permet aux chercheurs de ne pas allouer un grand espace comme pour une colonie de souris par exemple. Puis, par sa reproduction très utile puisque ce dernier peut avoir deux formes sexuées à savoir une forme hermaphrodite ou bien mâle. L'intérêt d'une telle chose est notamment génétique puisque

lorsqu'un hermaphrodite se reproduit, s'il n'y a pas de mâles à proximité, il fera de l'autofécondation. En fait, la détermination du sexe s'effectue par le ratio des chromosomes X sur les autosomes (c'est-à-dire les chromosomes non sexuels.) (Zarkower 2006). Effectivement, les hermaphrodites ont deux chromosomes X (noté XX) alors que les mâles n'en ont qu'un. De plus, le *C. elegans* ne possède pas de chromosome Y, de ce fait les mâles ont un génotype noté XO. Par ailleurs, on peut voir les hermaphrodites comme des femelles dont leurs gonades vont temporairement produire du sperme (au stade L4) qui sera stocké dans la spermathèque. Puis à l'âge adulte, la lignée germinale va alors produire des oocytes qui par la suite vont être fécondés par les spermatozoïdes stockés précédemment. Enfin, lors d'une autofécondation, seul un faible pourcentage de la descendance sera des mâles (<0.2%) (Nigon and Felix 2017), ce qui permet, si on avait induit des mutations chez le parent, de préserver celles-ci au fil des générations sans avoir besoin de refaire des croisements.

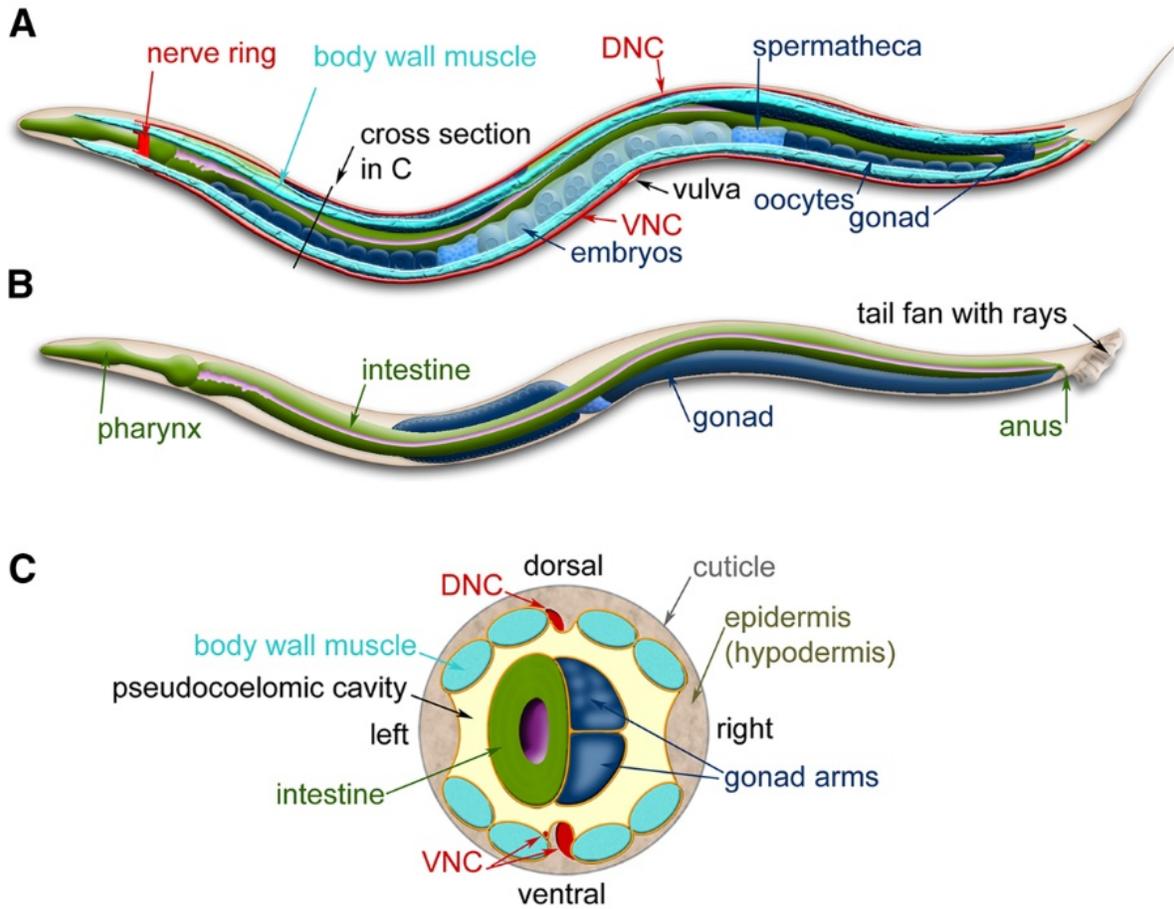
Outre l'intérêt génétique, le *C. elegans* possède aussi un cycle de développement très rapide (3 à 5 jours à 20°C) (Sulston and Horvitz 1977) le rendant particulièrement intéressant pour produire rapidement un nombre élevé de ver, permettant ainsi de faire aisément de multiples expériences avec une grande quantité d'individus. Les stades de développement chez le *C. elegans* sont bien segmentés avec 4 stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) ainsi qu'un stade adulte (Raizen, Zimmerman et al. 2008). De plus, il présente un cycle de vie assez court (entre 20 et 30 jours) (Johnson and Wood 1982), permettant donc aux scientifiques d'observer rapidement des phénomènes se décelant avec le temps, tel que le vieillissement ou bien la neurodégénérescence des neurones.

Pour finir, le *C. elegans* est aussi un bon modèle pour retranscrire ce que l'on voit chez l'humain puisque 60-80% des gènes humains ont un orthologue dans le génome du ver (Kaletta and Hengartner 2006), et 40% des gènes identifiés comme responsables de maladie humaine ont également un orthologue chez le nématode (Culetto and Sattelle 2000).

3.2 Anatomie du *C. elegans*

Bien que le *C. elegans* soit un organisme assez simple comparé à un être humain, il possède néanmoins des tissus bien définis (Figure 7) (Corsi, Wightman et al. 2015). On peut décrire ce nématode comme une série de tubes concentriques qui se caractérise par une couche extérieure nommée épiderme ou encore appelée hypoderme. Cette couche possède des cellules sécrétant la cuticule de l'animal, enveloppe constituée entre autre de collagène (Chisholm and Hardin 2005), protégeant l'animal contre diverses agressions possibles ainsi que les différents systèmes se trouvant à l'intérieur de cette dernière. De plus, juste en dessous de l'épiderme, vient se loger une série de 4 bandes musculaires le long de l'animal, lui permettant de se mouvoir par contraction et distension de celles-ci (Moerman and Fire 1997). C'est d'ailleurs à cause d'elles que le ver a un mouvement sinusoïdal qualifié d'élégant, ce qui lui aura valu son nom *C. elegans*. Puis c'est au tour des cordes nerveuses ventrales et dorsales de venir s'innover sur les muscles (Silhankova and Korswagen 2007) (Sulston and Horvitz 1977). Enfin, l'appareil digestif, excrétoire et reproducteur se retrouvent à l'intérieur de la région neuromusculaire.

Figure 7. – Représentation schématique de l'anatomie générale du *Caenorhabditis elegans*



Corsi, A. et coll, 2015, Genetics

Légende : Anatomie d'un hermaphrodite (en A) et d'un mâle (en B) d'un point de vue latérale. On observe bien les couches composantes le *C. elegans*, à savoir (de l'extérieur vers l'intérieur) : l'épiderme ensuite la couche musculaire innervée par les deux cordes nerveuses. Entre les muscles et le système nerveux se trouve l'appareil reproducteur avec les gonades, ainsi que l'appareil digestif (intestin) et excrétoire (anus). Une section de la région antérieure du vers hermaphrodite (en C) est représentée, révélant les 4 quadrants musculaires en périphérie surmontés par l'épiderme et la cuticule. Dans la cavité pseudo-cœlomique se retrouve les intestins et les gonades. DNC : corde nerveuse dorsale. VNC : corde nerveuse ventrale. Body wall muscle : couche musculaire. Right : droit. Left : gauche. Vulva : la vulve. Spermatheca : Spermathèque. Tail : queue.

3.3 Le Système Nerveux du *C. elegans*

Le *C. elegans* dans sa forme hermaphrodite possède exactement 302 neurones et 56 cellules gliales alors que le mâle en possède 383 (Sulston and Horvitz 1977) (Ward, Thomson et al. 1975). Les cellules supplémentaires chez le mâle se situent au niveau postérieur de l'animal et sont principalement impliquées dans le comportement d'accouplement de ce dernier (Sulston, Albertson et al. 1980). Le système nerveux du *C. elegans* peut être subdivisé en 2 organisations distinctes et indépendantes à savoir un système nerveux somatique (composé de 282 neurones) et un petit système nerveux pharyngien (20 neurones) (White, Southgate et al. 1983) (Sulston, Schierenberg et al. 1983). Les cellules somatiques du nématode sont invariantes, ce qui a permis aux chercheurs de l'époque de retracer le destin de chaque cellule du développement jusqu'à l'âge adulte (Kimble and Hirsh 1979). Par conséquent, on a pu faire une reconstruction de tout le système nerveux du *C. elegans*, permettant par la suite de faire des criblages génétiques sur des gènes conduisant à des problèmes de développements ou de comportements lorsqu'ils sont mutés. Étant donné la nature invariante de ces cellules, il n'est pas étonnant que le *C. elegans* fût le premier organisme pluricellulaire ayant eu son génome totalement séquencé, facilitant ainsi la compréhension et l'identification de gènes clés dans des processus cellulaires importants (*C. elegans* Sequencing Consortium 1998).

Le système locomoteur du *C. elegans* implique 113 neurones sur les 302 chez l'hermaphrodite, qui se classent en 8 catégories distinctes (AS, DA, DB, DD, VA, VB, VC et VD) (White, Southgate et al. 1986) (White, Southgate et al. 1976). De plus, il existe aussi 3 groupes de motoneurones, les classes A et B (VA, VB, DA, DB AS) étant cholinergiques et donc excitateurs, permettant ainsi la contraction des muscles de façon unilatérale, alors que la classe D (VD, DD) est quant à elle GABAergique (pour acide gamma aminobutyrique) et donc inhibitrice.

3.4 Locomotion du Ver : GABA et Acétylcholine

Les neurotransmetteurs impliqués dans la locomotion chez le *C. elegans* sont le GABA et l'acétylcholine. Pour ce qui est du GABA, parmi les 302 neurones que comprend le ver, seuls 26 d'entre eux sont GABAergique. Au sein de ces 26 neurones, il y a 6 DD, 13 VD, 4 RME, 1 RIS, 1 AVL et 1 DVB (Jorgensen 2005). Les DD et VD innervent les muscles dorsaux et ventraux respectivement. Les RME se retrouvent au niveau des muscles de la tête du ver. Enfin les DVB et AVL ont leurs localisations dans les muscles entériques (pour la défécation), alors que le RIS est un interneurone. De manière générale, la fonction du neurotransmetteur GABA est inhibitrice, mais pour les neurones AVL et DVB, son rôle est excitateur, permettant ainsi la contraction des muscles entériques et donc la défécation (White, Southgate et al. 1986).

Pour l'acétylcholine, environ 120 neurones chez un hermaphrodite, seraient cholinergiques. Là encore, plusieurs classes sont présentes, notamment les AS, DA, DB, VA, VB et VC qui innervent principalement la corde nerveuse ventrale de l'animal et qui ont un rôle dans sa locomotion (Rand 2007). Comme pour le GABA, l'acétylcholine a un rôle majeur dans le mouvement du ver, tellement que, si on mute le gène *cha-1* (gène codant pour la choline O-acétyltransférase) ou *unc-17* (codant pour un transporteur d'acétylcholine, nécessaire pour la transmission synaptique), les vers montrent une réduction dramatique du mouvement. La fonction de ces neurones cholinergiques est de soit exciter de façon longitudinale les muscles qu'ils innervent au niveau de la jonction neuromusculaire ou alors d'activer les neurones GABAergiques qui inhiberont les muscles controlatéraux afin de générer un mouvement coordonné de l'animal.

Enfin, les motoneurones de classe A contrôlent les mouvements vers l'arrière alors que ceux de classe B supervisent les mouvements vers l'avant. Les neurones de classe D quant à eux, reçoivent les synapses soit des A soit des B, et fonctionnent comme inhibiteurs croisés sur les muscles controlatéraux. Ce système neuronal permet un mouvement ondulatoire du ver qui change selon les stimuli rencontrés. En effet, si l'on touche la partie antérieure du *C. elegans* et donc active les neurones de la tête, le signal se propagera jusqu'à la partie postérieure, entraînant une contraction de cette dernière qui se traduira par un recul de l'animal. Si on touche sa partie postérieure, il se passera l'effet inverse et le nématode avancera (Gray, Hill et al. 2005).

3.5 Le *C. elegans* : Un Bon Modèle

Le *C. elegans* possède de nombreux avantages (petite taille, durée vie assez courte, autofécondation) qui en fait un modèle de choix pour le laboratoire. De plus, depuis le séquençage au complet de son génome en 1998, il a été identifié qu'environ 40% de ces gènes ont un orthologue associé à une maladie neurodégénérative chez l'homme tel que Alzheimer avec APP (APL-1 chez le vers) et Tau (PTL-1 chez le vers) (Shaye and Greenwald 2011).

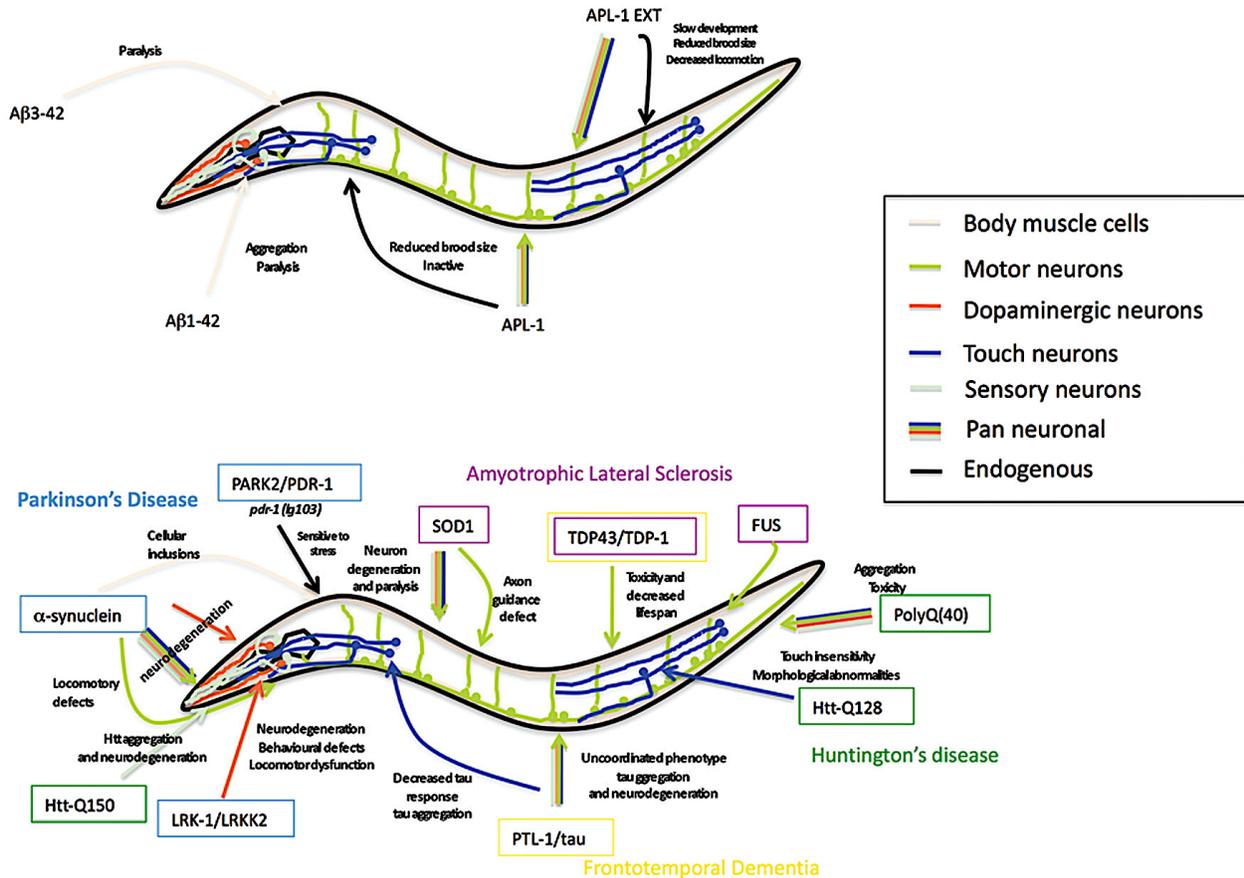
De surcroît, dans le domaine du *C. elegans*, de nombreuses techniques ont été mises au point tel que les ARNi (pour ARN interférence) (Spracklin, Fields et al. 2017), le criblage de médicament pour identifier des voies biologiques impliquées dans certaines maladies (Ma, Zhao et al. 2018), ou bien encore l'induction de mutations dans certain gène pour mieux comprendre le rôle de certaines protéines (Brenner 1974). De plus, il existe aussi de nombreuses lignées transgéniques de nématodes, exprimant des gènes humains impliqués dans des maladies neurodégénératives (Figure 8). Cela permet de retranscrire ce qui se passe chez l'homme en condition pathologique, afin d'avoir un modèle le plus représentatif possible tout en s'affranchissant de la barrière humaine ainsi que de la forte hétérogénéité que l'on retrouve chez les humains.

Par ailleurs, même si l'utilisation de cellules de patients (*in vitro*) est aussi intéressante pour étudier une maladie, certains effets ne sont visibles que lorsque plusieurs systèmes interagissent entre eux, nécessitant alors un organisme entier tel que le ver (*in vivo*). Toutefois, le *C. elegans* n'en reste pas moins un modèle et comme tel, il a ses limites. Par exemple, à cause de la technique d'intégration utilisée pour insérer le transgène dans leurs génomes, de nombreuses souches transgéniques vont surexprimer la protéine ce qui provoque un biais puisque le niveau d'expression peut être bien supérieur à ce que l'on observe *in vivo* (Alexander, Marfil et al. 2014). Néanmoins, comme toujours, il faut déterminer au préalable la force du modèle utilisé et pourquoi on l'utilise.

Dans le cas du *C. elegans*, ce qui en fait un très bon modèle d'étude, est la mise à disposition de nombreux outils génétiques pour caractériser et comprendre une maladie. De plus, l'un de ses principaux avantages est la possibilité d'étudier rapidement la fonction d'une protéine

ainsi que de découvrir des drogues pouvant améliorer le phénotype observé ou encore de repérer des voies biologiques impliquées dans la maladie considérée.

Figure 8. – Représentation schématique de quelques modèles de *C. elegans* utilisés dans diverses maladies neurodégénératives



Alexander, A. et coll, 2014, *Frontiers in Genetics*

Légende : Représentation d'un modèle transgénique de la maladie d'Alzheimer (en A) et exprimant le peptide Aβ humain ou alors l'Aβ endogène à savoir APL-1. Résumé de modèles de C. elegans (en B) modélisant certaines maladies neurodégénératives telles que Alzheimer, Huntington ou encore Parkinson. Les flèches de couleur réfèrent aux tissus dans lesquels sont exprimés les gènes. Le texte écrit à côté des flèches est un résumé de chaque phénotype observé.

3.6 Les Modèles *C. elegans* de Tauopathies

Il existe de nombreux modèles de tauopathies utilisant le *C. elegans* (Tableau 1). Puisque la protéine tau chez l'humain est exprimée dans tous les neurones, il est normal que les premiers modèles de *C. elegans* exprimant une tau humaine soient *pan* neuronale (Pir, Choudhary et al. 2017). Cette expression généralisée permet d'observer si une sous population de neurones est plus vulnérable qu'une autre par exemple.

Les premiers modèles exprimaient soit une tau humaine dite wild-type (c'est-à-dire sauvage, sans modifications) ou encore une tau mutée, modélisant ainsi des démences fronto-temporales (P301L, V337M) (Kraemer, Zhang et al. 2003) (Li and Le 2013). Ces modèles ont pour promoteur *aex-3*, impliqué dans la relâche de vésicules synaptiques intracellulaires et module l'activité neuronale entre autre (Pir, Choudhary et al. 2017). Ces transgéniques présentent des déficiences dans la locomotion à cause d'une perturbation présynaptique associée à l'agrégation de la protéine tau et la neurodégénérescence des neurones.

Par la suite d'autres modèles ont fait leurs apparitions, toujours *pan* neuronal mais avec des promoteurs différents comme par exemple *rab-3* ou *snb-1*, encodant pour une Rab et une synaptobrevine respectivement (Fatouros, Pir et al. 2012). Dans le modèle *snb-1*, c'est une tau mutée qui est exprimée à savoir la A152T, mutation retrouvée chez des patients PSP (Kovacs, Wohrer et al. 2011) (Kara, Ling et al. 2012). Les vers développent rapidement des problèmes moteurs ainsi que des dysfonctionnements neuronaux. De plus, les neurones mécanosensoriels du ver montrent une morphologie pathologique avec des embranchements supplémentaires anormaux. Enfin les animaux présentent une durée de vie raccourcie soulignant la toxicité de la mutation (Pir, Choudhary et al. 2016). Pour le modèle avec le promoteur *rab-3*, c'est une co-expression d'une tau mutée retrouvée dans les démences fronto-temporales (V337M) avec soit un fragment de tau pro-agrégante ou anti-agrégante. Le modèle pro-agrégat présente une paralysie importante des vers, une dégénération axonale des neurones GABAergiques et cholinergiques, des perturbations présynaptiques, une perte de synapses ainsi qu'un problème dans le transport mitochondrial (Fatouros, Pir et al. 2012).

Toutefois, l'expression *pan* neuronale a des limites, et peut par exemple induire une forte toxicité du fait de l'expression excessive de la protéine. C'est pourquoi, d'autres chercheurs se sont tournés sur une expression plus localisée de la protéine afin de minimiser les effets néfastes liés à la surexpression de tau. De plus, cibler une sous population de neurone permet de tenter des *rescue* de phénotype (améliorer le phénotype), comme ce qui a été fait dans des modèles de *C. elegans* mutant n'exprimant plus *ptl-1* et qui, par la re-expression de ce dernier, a permis de rallonger la durée de vie du ver ainsi que de ralentir le vieillissement des neurones (Chew, Fan et al. 2013). Cela a permis de comprendre le rôle de la tau endogène chez le ver, son implication dans l'éclosion des œufs, la maintenance de l'intégrité neuronale ou encore la régulation du cycle de vie du nématode. Enfin, des scientifiques ont généré un autre modèle, exprimant une tau mutée (P301L, R406W) uniquement dans les mécanosensoriels via le promoteur *mec-7* (Miyasaka, Ding et al. 2005). Les vers montrent une diminution de la réponse sensorielle avec l'âge, l'apparition d'anomalies morphologiques au niveau des neurones ainsi qu'une perte de microtubules.

Tableau 1. – Liste des principaux modèles de *C. elegans* pour les Tauopathies.

Promoteur	Expression	Protéine	Phénotype	Référence
<i>aex-3</i>	<i>Pan</i> neuronale	Tau WT, P301L, V337M	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience locomotion - Agrégation - Neurodégénérescence 	(Iwasaki, Staunton et al. 1997)
<i>rab-3</i>	<i>Pan</i> neuronale	Tau V337M + Pro/Anti agrégante (Δ K280)	<ul style="list-style-type: none"> - Paralysie - Dégénérescence GABA neurones - Problème synaptique - Transport mitochondrial perturbé 	(Nonet, Staunton et al. 1997)
<i>snb-1</i>	<i>Pan</i> neuronale	Tau A152T	<ul style="list-style-type: none"> - Problèmes moteurs - Morphologie pathologique mécanosensoriel - Durée de vie plus courte 	(Nonet, Saifee et al. 1998)
<i>ptl-1</i>	Neurones Mécanosensoriels	Tau endogène mutée	<ul style="list-style-type: none"> - Durée de vie plus courte - Vieillessement neuronal 	(McDermott, Aamodt et al. 1996)
<i>mec-7</i>	Neurones Mécanosensoriels	Tau P301L, R406W	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution réponse neurone sensoriel - Anomalies morphologiques - Perte microtubule 	(Hamelin, Scott et al. 1992)

Modifié de Mandelkow, E. et coll, 2017, The FASEB Journal

4. Objectifs de l'étude

Dans la maladie d'Alzheimer, deux protéines sont impliquées. L'une d'entre elle se trouve être la tau, une protéine retrouvée hyperphosphorylée dans les cerveaux de patients Alzheimer (Gendron and Petrucelli 2009). Depuis la découverte des NFTs dans des régions du cerveau, de nombreuses études ont montré que la protéine tau hyperphosphorylée, semblait perdre ses fonctions physiologiques et que, par conséquent, cet excès de phosphorylation serait à l'origine de la toxicité de cette dernière (Wang and Mandelkow 2016). Néanmoins, même si cette idée est ancrée dans l'esprit de nombreux scientifiques et à raison, il existe aussi beaucoup de preuves venant remettre en cause l'hypothèse supposant que la phosphorylation excessive serait pathologique. En effet, des articles scientifiques ont montré que les NFTs pouvaient avoir un effet protecteur (Castellani, Nunomura et al. 2008), et que la forme la plus toxique de la protéine serait lorsqu'elle est soluble, ce qui ne serait pas surprenant puisque le même constat a été fait pour les plaques amyloïdes et les oligomères A β (Tu, Okamoto et al. 2014). À cela s'ajoute l'émergence de quelques études, montrant qu'une tau hypophosphorylée serait également toxique pour les neurones, résultats pouvant expliquer l'échec d'essais cliniques visant à réduire la phosphorylation de la protéine tau (Mehta, Jackson et al. 2017).

L'objectif de notre étude est donc de déterminer quel est le degré de phosphorylation de la tau nécessaire pour que celle-ci soit toxique au niveau des neurones. Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse que plus la tau serait phosphorylée, plus elle aurait un effet toxique. Les objectifs de ma maîtrise étaient de :

1. Générer trois souches transgéniques de *C. elegans* exprimant trois degrés différents de phosphorylation de la protéine humaine tau.
2. Caractériser les modèles afin de déterminer quel degré de phosphorylation serait toxique pour les nématodes
3. Tenter d'identifier des voies biologiques par lesquelles la protéine induirait sa toxicité

Pour cela, nous utilisons une tau humaine, l'isoforme 0N4R, avec ou sans mutations puisque c'est l'isoforme la plus petite en terme de taille et possédant le plus de domaines de liaisons aux microtubules. En effet, par deux fois nous avons muté la protéine tau, au niveau de 12 sites proches de la région riche en proline, région retrouvée phosphorylée chez des patients Alzheimer (Lau, Hogseth et al. 2016). L'intérêt de ces mutations est de mimer une tau soit hypophosphorylée, par l'utilisation d'alanine (A), acide aminé neutre qui empêche l'ajout d'un phosphate, soit hyperphosphorylée par l'utilisation de glutamate (E), acide aminé ayant une charge négative comme le phosphate. De plus, cette tau humaine soit sauvage soit mutée, va être exprimée uniquement au niveau des motoneurones GABAergiques du *C. elegans*. Finalement le choix des motoneurones GABAergiques s'explique par la facilité de détecter un phénotype puisqu'ils permettent le mouvement chez le ver.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

2.1 Génération des souches et maintenance

Les conditions standards ont été appliquées pour la maintenance du *C. elegans* (Stiernagle 2006). Les vers étaient gardés dans du NGM (pour *Nematode Growth Medium*) sur lequel nous avons déposé de *Escherichia coli* (*E. coli*) OP50 comme source de nourriture. Les nématodes pour toutes nos expériences étaient conservés à 20°C. La souche N2 dite sauvage, utilisée dans ce mémoire provenait du *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) à l'université du Minnesota. Les souches transgéniques ont été générées par injection de deux plasmides, un contenant la tau humaine (ON4R) sous le contrôle du promoteur *unc-47*, le second plasmide était un marqueur de co-injection, exprimant la GFP ou mCherry sous le contrôle du promoteur *myo-2*. Pour mimer l'hypophosphorylation ou l'hyperphosphorylation de la protéine tau, nous avons induit 12 mutations sur des sites proches de la région riche en proline de la protéine, afin de remplacer les acides aminés présents par de l'alanine (A12) ou du glutamate (E12) respectivement (Plouffe, Mohamed et al. 2012). Dans le but d'intégrer les plasmides aux génomes des vers, nous avons utilisé les ultraviolets (0.012J/cm²) afin de recruter les processus de réparation de l'ADN chez le nématode (Mariol, Walter et al. 2013). Toutes les souches transgéniques utilisées ont été croisées 6 fois (*outcross*) avec la souche N2. Les progénitures positives pour GFP ou mCherry ont été sélectionnées puis contrôlée par PCR afin de déterminer la présence ou non de la tau humaine.

Construction de nos souches transgéniques :

- Tau WT (ON4R) : *unc-47p* ::hTau + *myo-2p* ::GFP
- Tau HyperP (ON4R) : *unc-47p* ::hTau(E12) + *myo-2p* ::mCherry
- Tau HypoP (ON4R) : *unc-47p* ::hTau(A12) + *myo-2p* ::mCherry

Séquence de la Tau humaine Wild Type :

5'ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTTGGGGGAC
AGGAAAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAG
CTGAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCT
CGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTA
AAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGG
ATTCCAGCAAAAACCCCGCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAATCAGGGGATC
GCAGCGGCTACAGCAGCCCCGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAAC
CCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTA CTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAA
GAGCCGCCTGCAGACAGCCCCGTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCAC
TGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCA
ACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAG
TCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAAC
AGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTG
GGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCT
TCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCT
GGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGCCCC
AGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTG 3'

Séquence de la Tau humaine E12 :

5'ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTTGGGGGAC
AGGAAAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAG
CTGAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCT
CGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTA
AAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGG
ATTCCAGCAAAAACCCCGCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAATCAGGGGATC
GCAGCGGCTACAGCGAAACCCGGCGAAACCAGGCGAAACCCGGCAGCCGCTCCCGCACCCCGGAACTTCCA
ACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGAGAACCACCCAAGGAGCCGTCTTCCGCC
AAGAGCCGCCTGCAGACAGCCCCGTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGC~~GAA~~
ACTGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAG
CAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAAT
AGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAA
CCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGAT
TGGG~~GAA~~ACTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGAC
CTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAG~~GAG~~CCAGTGGTGG
~~AA~~GGGGACACG~~GAA~~CCACGGCATCTCAG~~GAA~~TGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGC
CCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTG 3'

Séquence de la Tau humaine A12 :

5'ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTTGGGGGAC
AGGAAAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAG
CTGAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCT
CGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTA
AAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGG
ATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAATCAGGGGATC
GCAGCGGCTACAGCGCCCCCGCGCCCCAGGCGCTCCCGGCAGCCGCTCCCGCACCCCGGCCCTTCAA
CCCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTGCTCCACCCAAGGCGCCGTCTTCCGCCA
AGAGCCGCTGCAGACAGCCCCGTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCCCA
CTGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGC
AACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATA
GTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAAC
CAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATT
GGGGCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACC
TTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCAGGGGCGGAGATCGTGTACAAGGCCAGTGGTGGC
TGGGGACACGGCTCCACGGCATCTCGCCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGCCC
CAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTG 3'

2.2 Séquençage des souches

Nous avons envoyé à faire séquençer nos souches au Centre d'expertise et de services Génome Québec. Pour cela nous avons préparé 8 tubes pour chaque souche, ainsi que nos amorces à une concentration de 5µM. Par la suite, nous avons reçu nos séquences par mail et nous les avons alignées avec la protéine tau humaine 0N4R grâce au logiciel Serial Cloner®. Les amorces utilisées ont été commandées chez Invitrogen®. Le nom des deux amorces est Celegans_REV (Séquence de 5' vers 3' : GCT CTT ATC CCA CTT TGT ACA AGA AAG CT) et TauFWDnt326 (Séquence de 5' vers 3' : CGC CAC CAG GAT TCC AGC AAA).

2.3 RT-PCR

Les échantillons d'ARN sont obtenus grâce à 10 plaques confluentes de vers, suivis d'une extraction au Trizol (Invitrogen®)/chloroforme. Puis, on ajoute 500µL de Trizol et on homogénéise à l'aide d'une seringue. Ensuite, nous avons fait une incubation de 5 minutes à température pièce pour compléter la dissociation des complexes nucléoprotéiques. Puis nous avons ajouté 300µL de chloroforme par 1 mL de Trizol, suivit d'une agitation des tubes pendant 15 secondes pour ensuite attendre 2-3 minutes à température pièce. Par la suite nous avons centrifugé à 12 000g pendant 15 minutes à 4°C. L'ARN se retrouvait dans la phase aqueuse. Ensuite nous avons transféré le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf®. Puis on ajoutait un volume d'éthanol 70% et on vortexait sans centrifuger. Par la suite nous avons utilisé le kit RNeasy® par Qiagen® (ID : 74104) et nous avons transféré 700µL d'échantillons dans la colonne d'un tube collecteur fourni dans le kit. Puis nous avons effectué une centrifugation à température pièce pendant 30 secondes à 8000g et jeté le liquide passé à travers la colonne. Ensuite nous avons ajouté 700µL de RWI (fourni dans le kit), centrifugé 30 secondes puis jeté le liquide s'écoulant à travers la colonne. Enfin, nous avons ajouté 500µL de RPE (fourni dans le kit), centrifugé 30 secondes et jeté le liquide s'écoulant à travers la colonne (faire cela 2 fois). Finalement, nous avons jeté une dernière fois le liquide s'écoulant de la colonne puis fait une centrifugation pendant 2 minutes à vitesse maximale pour sécher la colonne de tout l'éthanol. Pour finir, nous avons transféré dans un nouveau tube Eppendorf® de 1.5mL puis ajouté 50µL d'H₂O sans ARNase ou ADNase (fournie dans le kit). Suite à l'extraction, nous avons dosé notre ARN par Nanodrop®. Finalement, nous avons converti notre ARN en ADNc en utilisant le kit fourni par Invitrogen®, nommé *SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit*® (Numéro de Catalogue 11754050). Pour générer notre ADNc avec nos ARN précédemment extraits, nous avons effectué une PCR mettant dans chaque puits, 4µL de 5X Vilo® (fourni dans le kit et correspondant au buffer de l'enzyme), 2µL de 10X SuperScript III Enzyme Blend® (fournie dans le kit et correspondant à la reverse transcriptase) et 14 µL d'ARN dilué dans de l'eau contenant 100ng d'ARN. Pour finir, une fois notre ADNc obtenu, nous avons effectué un RT-PCR afin de quantifier le niveau d'ARNm du gène codant pour la tau humaine, dans nos souches transgéniques. Pour cela, nous avons utilisé le Taqman Universal Master Mix II® par ThermoFisher® (Numéro de Catalogue 4440048). Dans chaque puits de notre plaque, nous avons

mis 0.5µL de nos amorces, 5µL du buffer fourni par le kit, ainsi que 3.5µL d'H₂O. Finalement nous avons ajouté 1µL de notre ADNc dans chaque puits pour un volume total de 10µL par puits. Les amorces utilisées : ID# Hs00902194_m1 (Applied Biosystems® par Thermo Fisher Scientific®).

2.4 Western Blot

Une quinzaine de grandes plaques confluentes de vers pour chaque souche ont été collectées avec du tampon M9 (3g KH₂PO₄, 6g Na₂HPO₄, 0.5g NaCl, 1g NH₄Cl, qsp 1 litre avec H₂O). L'extraction fût faite avec un tampon de lyse contenant 50mM HEPES pH 7.4, 1mM EGTA, 1mM MgCl₂, 10% glycérol, 0.05% NP-40 et une tablette d'un mélange d'inhibiteurs de protéases). Les vers étaient soniqués pendant 3 minutes puis centrifugés à 20 000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant fût quantifié en utilisant le Quick Start™ Bradford 1X Dye Reagent® (fourni par Bio Rad®). La partie basse du gel du Western Blot était un 10%, contenant 3.125mL dH₂O, 2.5mL d'acrylamide 30%, 1.875mL de Lower Tris Buffer 4X, 60µL d'APS (pour Pierce Ammonium Persulfate) 10% et 20µL de TEMED. La partie haute du gel était un 3.75% contenant 3.25mL dH₂O, 650µL d'acrylamide 30%, 1.25mL d'Upper Tris Buffer 4X, 37.5µL d'APS 10% et 12.5µL de TEMED. La migration s'effectuait à 150V pendant 75 minutes dans un tampon de migration composé de SDS 20%, d'H₂O et d'un tampon d'élution 10X. Le transfert s'effectuait sur une membrane de nitrocellulose (de Bio Rad®) pendant 60 minutes dans un tampon de transfert contenant du dH₂O, méthanol et tampon d'électro 10X. Le transfert était suivi d'un blocage d'une heure, dans du lait avec TBS-T (5g de lait et 100mL de TBS-T) (pour *Tris-buffered Saline*). Le TBS-T contenait 100mL de TBS 10X, 898mL dH₂O et 2mL de Tween 20. Enfin les anticorps utilisés étaient : un polyclonal de lapin anti-tau humaine (1:10 000, Dako®), un AC de souris anti-actine (1 :25 000, MP Biomedical®), un AC anti-lapin HRP (pour *Horseradish Peroxidase*) (1 :10 000, Jackson ImmunoResearch®), et un AC anti-souris HRP (1 :10 000, Jackson ImmunoResearch®). Les blots ont été visualisés avec un AC secondaire peroxidase conjugué, et l'ECL (pour *Enhanced Chemiluminescence*) (GE Healthcare®). L'échelle de poids moléculaires utilisée était la *Precision Plus Protein™ Standard* (Bio Rad®). L'acquisition et la quantification ont été faites avec ImageLab®.

2.5 Test de Paralysie

Nos trois souches transgéniques ainsi que le N2 (étant notre contrôle) ont été marqués pour la paralysie débutant au jour 1 adulte jusqu'au jour 15. 30 vers au stade L4 (obtenu par synchronisation) ont été transférés sur des plaques contenant du NGM et de l'OP50 à tous les jours à partir du jour 1 adulte. Un ver était considéré comme paralysé s'il ne pouvait pas bouger après un stimulus induit par le pic de l'expérimentateur. Nous avons exclu les vers morts ainsi que ceux qui «disparaissaient». Les expériences se sont déroulées à 20°C et chaque condition a été faite qu'une seule fois avec 30 vers par plaque (3 plaques par souches).

2.6 WormTracker®

Pour ce qui concerne le WormTracker®, nous avons utilisé pour chacune de nos souches, que ce soit les trois transgéniques ou encore le contrôle (N2), des synchronisations de vers jour 1 adulte. Pour une expérience et pour une souche, trois puits étaient remplis de M9 afin de permettre aux vers de nager. De plus, dans chaque puits nous avons mis une trentaine de vers, nombre suffisant pour que le faisceau de la machine puisse détecter une activité. Enfin, nous avons laissé la machine mesurer l'activité de chaque puits pendant 300 minutes, puis nous avons obtenu un fichier Excel avec la quantification de l'activité par puits.

2.7 WormLab® : Vitesse de Nage

Les *C. elegans* étaient placés sur des plaques d'agar NGM contenant de l'OP50 au centre afin que les animaux restent concentrés au milieu de la plaque, dans le champ de vision de la caméra. Pour chaque souche, nous avons utilisé 3 plaques contenant chacune 30 vers âgés soit du jour 1, 5, 9 ou 13 adulte. Dans le but d'obliger les vers à bouger, nous avons ajouté 100µL de M9 sur les plaques d'agar afin que les vers puissent nager. A l'aide d'une caméra (caméra CMOS) fixée sur un microscope à dissection (le Stereomicroscope Leica S9i), nous avons pris des vidéos d'une durée de 30 secondes chaque. Enfin, pour l'analyse le logiciel WormLab® nous permettait de calculer pour chaque ver se trouvant sur la plaque, la vitesse à laquelle il nageait. Les expériences ont été faite à 20°C. 90 vers pour chaque souche ont été utilisés et les expériences ont été produites en triplicatas.

2.8 Test de Neurodégénérescence

Pour évaluer les processus neuronaux conduisant à des trous dans l'axone (*gap*), les animaux exprimant la protéine tau humaine ont été croisés avec une souche exprimant une protéine fluorescente (mCherry) dans les neurones moteurs GABAergiques. Les animaux ont été observés à jour 5 ou 9 adulte pour la visualisation des neurones *in vivo*. Les animaux ont été immobilisés avec du M9 contenant 5mM de levamisole et montés sur des lames de verre sur lesquelles se trouvaient des blocs d'agar 2%. La fluorescence de mCherry fût observée à une longueur d'onde d'excitation de 577nm et d'émission de 603nm en utilisant le microscope Zeiss Cell Observer Z1®. Le logiciel utilisé pour observer ces résultats est le Zen Blue®. Chaque expérience correspond à 25 vers, et toutes les expériences se sont passées à 20°C.

2.9 WormLab® : Taille des Vers

Pour analyser la taille de vers, le même logiciel a été utilisé que pour la mesure de la vitesse de nage. Le même nombre de ver ainsi que la durée des vidéos ont été utilisés. Cependant, la seule différence est que les vers ne nageaient pas dans du M9 mais étaient simplement sur de l'agar solide avec de l'OP50 en son centre. Les vers ont été analysés aux jours 1, 5, 9 et 13 adulte. Chaque n correspond à 90 vers répartis sur 3 plaques de 30 animaux chacune. Les expériences se sont passées à 20°C.

2.10 Test de Progéniture

Des hermaphrodites L4 ont été placés individuellement sur des plaques de pétri et transférés tous les jours sur de nouvelles plaques jusqu'à la mort de tous les animaux ou qu'il n'y ait plus de production d'œufs pendant au moins deux jours. La progéniture est comptée en utilisant un microscope à dissection 2 jours après le transfert sur une nouvelle plaque. 10 animaux ont été utilisés pour chaque souche et pour chaque expérience. Les expériences ont été réalisées à 20°C. Pour plus de détails sur le protocole, voici l'article source en référence (Hughes, Evason et al. 2007)

2.11 Lifespan

90 vers (obtenus par synchronisation) pour chaque souche (3 plaques de 30 vers chacun) ont été testés quotidiennement dès le jour 1 adulte et jusqu'à la mort de tous les animaux présents sur chaque plaque. Les vers étaient transférés tous les jours sur de nouvelles plaques la première semaine afin d'éviter de transférer la progéniture avec, puis tous les deux jours la deuxième semaine. Les vers étaient identifiés comme morts s'ils ne bougeaient plus suite à un stimulus tactile et ne montraient pas de mouvements spontanés. La mort des animaux suite à un problème d'expulsion des œufs, le développement de la progéniture à l'intérieur de l'adulte ou encore suite à un dessèchement du ver se trouvant sur le bord de la plaque, ont été exclus. L'ensemble des expériences a été fait à 20°C.

2.12 Utilisation des Drogues

La concentration d'Azaperone (Numéro de Catalogue Y0000029, Sigma Aldrich®) utilisée dans nos expériences était de 50µg/mL d'agar. On solubilisait la poudre stock dans de l'éthanol (EtOH) à raison de 34mg/mL. Puis on prélevait le volume souhaité pour obtenir une concentration dans chaque plaque de 50µg/mL. La concentration d'Acide Tannique (Numéro de Catalogue 1401-55-4, Sigma Aldrich®) utilisée dans nos expériences était de 100µM. On solubilisait la poudre stock dans de l'éthanol à raison de 100mg/mL. La concentration de l'Éthoxusimide (Numéro de Catalogue E7138, Sigma Aldrich®) utilisée dans nos expériences était de 2mg/mL. On solubilisait la poudre stock dans de l'éthanol à raison de 100mg/mL. La concentration du Curcumin (Numéro de Catalogue C1386, Sigma Aldrich®) utilisée dans nos expériences était de 12,5µg/mL. On solubilisait la poudre stock dans de l'éthanol à raison de 10mg/mL.

La drogue s'ajoutait pendant que l'agar était encore liquide. La conservation des plaques avec composé se faisait à 4°C, emballées dans de l'aluminium car les composés sont sensibles à la lumière, et les plaques ne durent pas plus de 3 jours dès que la drogue est ajoutée. Toutes les expériences faites avec les drogues, étaient réalisées à 20°C. Que ce soit pour WormLab® ou les tests de neurodégénérescence, les protocoles étaient les mêmes que ce qui a été décrit précédemment.

2.13 Analyse Statistique

L'analyse des données a été faite avec le logiciel Prism GraphPad (version 8.0). Les résultats sont représentés comme l'écart-type de la moyenne \pm SEM. Quand les résultats passaient la normalité, un test Ordinary One-way ANOVA était effectué. Les valeurs étaient considérées comme statistiquement significatives quand la valeur de probabilité (P) était inférieure à 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***), 0.0001 (****).

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Génération des souches transgéniques

3.1.1 Intégration et séquençage

Dans le but de répondre à notre hypothèse qui est de déterminer quel est le degré de phosphorylation de la protéine tau nécessaire à sa toxicité, il a tout d'abord fallu générer les souches et donc construire les plasmides pour les intégrer dans le génome du ver. Pour la génération des plasmides, nous avons fait appel à Mutagenex[®], qui par la technique de chimeragenèse, nous a renvoyé trois plasmides extra-chromosomaux (Figure 9A), contenant la protéine tau humaine (0N4R), soit sauvage soit mutée, sous le contrôle du promoteur *unc-47*. Les mutations de la protéine tau sont soit l'ajout de 12 glutamates (E12) soit de 12 alanines (A12), mimant ainsi l'hyperphosphorylation ou l'hypophosphorylation de la protéine respectivement. Ces mutations se trouvent au niveau de la région riche en proline, région retrouvée phosphorylée chez des patients atteints d'Alzheimer (Lau, Hogseth et al. 2016). Par la suite, il a fallu co-injecter deux plasmides dans des souches dites sauvages (à savoir les N2), l'un contenant la tau humaine sous le contrôle du promoteur *unc-47* afin d'exprimer cette dernière uniquement dans les motoneurones GABAergiques. Le second plasmide contient une protéine fluorescente à savoir, soit GFP (pour *Green Fluorescent Protein*) soit mCherry, sous le contrôle du promoteur *myo-2*, permettant d'exprimer la protéine uniquement dans les muscles de l'animal. En fait, l'intérêt de ce second plasmide est de faciliter la détection des souches qui ont intégré la protéine tau dans leur génome. En effet, les deux plasmides, lorsque co-injectés, forment des concatémères,

permettant de s'assurer que, lorsque l'on détecte un ver fluorescent, il a bien intégré l'autre plasmide contenant la protéine tau humaine. Toutefois, pour exclure les faux positifs ou négatifs, nous avons fait par la suite des PCR sur plusieurs vers de la même souche pour confirmer la présence du transgène. De plus, le fait de ne pas mettre la protéine fluorescente dans le même plasmide que le transgène, permet d'éviter que la fonction de la tau soit perturbée du fait de son étiquetage avec une protéine fluorescente volumineuse qui pourrait, par encombrement stérique, empêcher la tau d'interagir avec ses cibles. Par ailleurs, la GFP aurait aussi pu être mise dans le même plasmide que tau sans que celle-ci soit taggée avec la protéine fluorescente.

Figure 9. – Construction des modèles transgéniques de *C. elegans*.

- (A) Représentation schématique de la construction du plasmide contenant la protéine tau humaine sous le contrôle du promoteur *unc-47*, qui chez le ver permet l'expression de la protéine au niveau des motoneurones GABAergiques. Trois plasmides sont utilisés, l'un avec la protéine tau sauvage, c'est-à-dire sans modifications. Un autre contient une tau avec 12 sites ayant du glutamate afin de mimer l'hyperphosphorylation de la protéine (E12). Enfin, le dernier plasmide contient une tau humaine avec également les mêmes 12 sites mutés mais cette fois-ci avec de l'alanine comme acide aminé, mimant ainsi une hypophosphorylation (A12). Toutes ces modifications se retrouvent dans la région riche en proline de la protéine.
- (B) Alignement de deux séquences de la protéine tau, l'une étant sauvage, l'autre hyperP. La séquence 1, notée seq_1 représente la séquence en acide aminé de l'isoforme ON4R sauvage de la tau. La séquence 2, notée seq_2 représente la séquence en acide aminé de la tau hyperP. La présence de # signifie qu'une différence d'acide aminé est présente entre les deux séquences comparées. Dans ce cas-ci, la différence provient du remplacement de l'acide aminé d'origine par un glutamate, noté E (indiqué par une flèche rouge)
- (C) Alignement de deux séquences de la protéine tau, la première est la tau sauvage alors que la deuxième est une tau hypoP. La présence de # révèle la position de chaque alanine notée A (indiqué par une flèche verte) au niveau de la séquence de la protéine tau hypoP.

Une fois cette co-injection faite, les souches que nous avons reçues avaient certes la protéine d'intérêt mais elles n'étaient pas intégrées dans leur génome. En effet, les plasmides co-injectés sont extra-chromosomaux c'est-à-dire qu'ils gravitent autour du génome du ver. Si ce dernier venait à se reproduire, la plupart de sa descendance n'aurait pas le transgène puisque non intégré de base. La première étape fût donc d'intégrer les plasmides afin de conserver le transgène au fils des générations. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique basée sur les ultraviolets (UV). Effectivement, exposer des vers aux UV va produire des dommages dans leur génome, ce qui permettra le recrutement des mécanismes de réparation de l'ADN du *C. elegans*. Lors de la réparation de l'ADN, il se peut que les plasmides extra-chromosomaux qui, jusque-là, gravitaient autour du génome, soient captés et donc intégrés dans le génome du ver. Par la suite,

étant donné qu'une exposition importante aux UV peut générer des mutations non désirées, nous avons fait plusieurs croisements («*outcross*») entre nos vers fraîchement intégrés et des souches sauvages (N2). L'intérêt de ces croisements est de nettoyer le génome de mutations aléatoires qui pourraient induire un phénotype de par leurs localisations. Pour s'assurer que le phénotype observé est induit par le transgène, nous avons effectué 6 «*outcross*», nous permettant ainsi d'éliminer la majeure partie des potentielles mutations générées lors du processus d'intégration. Par ailleurs il est à noter que l'utilisation d'un tel processus d'intégration ne permet pas de garantir le contrôle du nombre de copies du transgène intégré dans le génome. En d'autres termes, nous ne savons pas avec exactitude combien de copies de la tau humaine se trouvent dans chacune des souches mais il est clair que nos souches possèdent plusieurs copies du transgène dans leur génome aussi appelée «*multiple copy*».

Une fois l'intégration terminée, nous avons voulu vérifier pour chaque souche, d'une part que le transgène était intégré, d'autre part que les 12 mutations induites étaient bien présentes. Pour ce faire, nous avons envoyé chaque souche à séquencer au Centre d'expertise et de services Génome Québec. Nous avons ensuite aligné les séquences par rapport à une tau humaine sauvage. Nos résultats montrent que les 12 mutations étaient bien présentes, que ce soit pour le glutamate (Figure 9B, flèche rouge) et pour l'alanine (Figure 9C, flèche verte), les mêmes sites étaient bien mutés.

3.1.2 Expression de la protéine Tau

La première chose que nous avons faite après l'intégration, fût de vérifier que le transgène était bien exprimé par le *C. elegans*. En effet, même si le transgène est intégré dans le génome, rien ne garantit sa transcription ainsi que la traduction en protéine. De ce fait, nous avons tout d'abord regardé au niveau de l'ARNm, en faisant une RT-qPCR (pour *real-time quantitative PCR*). Nous avons utilisé *ama-1*, une sous unité de l'ARN polymérase II chez le *C. elegans*, comme contrôle endogène. En effet, l'utilisation d'*ama-1* est très intéressante puisque contrairement à d'autres contrôles, celle-ci est très stable dans des modèles de neurodégénérescence (Li, Huang et al. 2013). De plus, l'utilisation d'un contrôle négatif (N2) permet de s'assurer que l'expérience a bien fonctionné et que les amorces utilisées sont bien spécifiques au transgène. Pour déterminer le niveau d'ARNm contenu dans chaque souche, nous avons fait une quantification relative, c'est-à-dire que nous avons rapporté le niveau de tau sur *ama-1*. Les résultats nous indiquent que pour les trois souches transgéniques, à savoir la tau «*wild type*», hypoP et hyperP, la quantité d'ARNm du gène codant pour la tau est significativement plus élevée que dans le contrôle négatif, indiquant que le transgène est transcrit dans nos modèles (Figure 10A). De plus, les niveaux d'ARNm entre les trois souches transgéniques sont quasiment similaires, permettant ainsi de comparer le phénotype observé de chacune des souches en excluant la possibilité que le phénotype aperçu dans une souche ne serait pas dû tant au transgène qu'à son niveau d'expression élevé.

Figure 10 Schramm et col.

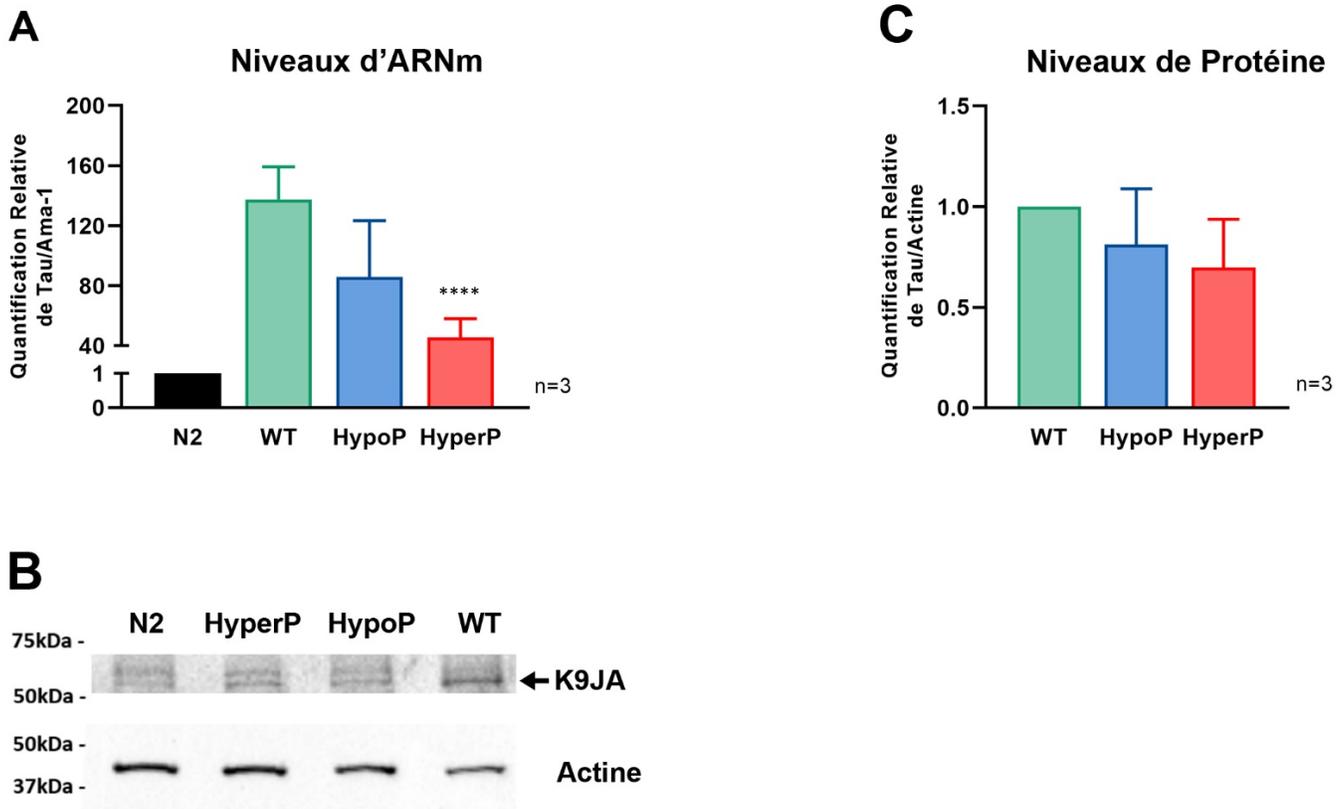


Figure 10. – Expression du transgène codant pour la tau dans le *C. elegans*

- (A) Quantification relative du niveau d'ARNm de tau dans les 3 modèles transgéniques rapporté sur *ama-1* (ARN polymérase chez le *C. elegans*). Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm de 3 expériences indépendantes. De plus, les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM pour «*Standard Error of the Mean*»). Les valeurs ont été testées par un *Ordinary one-way ANOVA* avec correction de Dunnett, **** $p < 0.0001$ par rapport au groupe Tau WT.
- (B) Western Blot détectant une bande vers 50 kDa avec l'AC K9JA, représentant la protéine tau humaine. Les autres bandes sont non spécifiques. Détection de la bande d'actine comme contrôle de chargement.
- (C) Quantification relative du niveau de protéines tau exprimé dans les trois souches transgéniques. Le niveau de tau est rapporté sur l'actine puis normalisé sur la tau WT afin

d'obtenir un ratio. Les résultats sont représentés comme la moyenne \pm de 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été testées par un *Ordinary one-way ANOVA* avec correction de Dunnett. Les barres d'erreurs représentent la moyenne avec SEM. Aucune différence significative entre chacune des souches n'a été trouvée.

Par la suite, nous avons voulu chercher à savoir si la protéine en elle-même était exprimée. Effectivement, il n'est pas certain quand bien même l'ADN est transcrit en ARNm, que ce dernier soit traduit en protéine. Pour répondre à cette interrogation, nous avons effectué un Western Blot, technique semi-quantitative, permettant de déterminer le niveau de protéine exprimée dans un modèle. Pour ce faire, nous avons utilisé K9JA, un anticorps polyclonal de lapin, reconnaissant la partie C-terminale de la tau humaine (Zempel, Thies et al. 2010). De plus, pour mesurer le niveau relatif de protéine tau, nous avons rapporté le signal produit par K9JA sur le signal d'un anticorps de souris reconnaissant l'actine et servant de contrôle de chargement. Nous avons pu détecter une bande avec l'anticorps (AC) K9JA dans les 50 kDa, poids moléculaire où la protéine tau doit se trouver (Figure 10B). Cependant, étant donné que nous sommes dans un modèle *C. elegans*, la plupart des AC vont produire de nombreuses bandes aspécifiques rendant difficile les techniques d'immunohistochimie telles que le Western Blot (Duerr 2006). Toutefois, grâce à l'utilisation de la souche N2 comme contrôle négatif, nous avons pu identifier une bande spécifique vers 50 kDa. Puis, pour la quantification, nous avons utilisé uniquement la bande du bas (puisque'étant la seule absente dans le contrôle N2, sur la base de plusieurs gels) que nous avons à chaque fois rapporté sur le signal d'actine symbolisant la fraction totale de protéines chez le ver. Étant donné l'absence de la protéine humaine tau pour les N2, nous avons par la suite, comparé les différentes souches par rapport à celle ayant la plus forte intensité, à savoir la tau WT («*wild type*») dans notre cas. Pour la clarté des résultats, nous avons effectué un ratio pour chaque souche par rapport à celle exprimant la tau WT. Suite à la quantification, nous pouvons voir que le niveau d'expression protéique est similaire entre les trois souches (Figure 10C). De plus, même si la souche hyperP exprime moins fortement la protéine, ce n'est pas un problème étant donné que c'est la souche présentant le plus fort phénotype parmi les 3 modèles transgéniques. De ce fait, même avec une expression plus faible, cela reste suffisant pour

apercevoir les effets néfastes de la protéine quand celle-ci est hyperP. Nous pouvons donc exclure l'idée que le phénotype observé est dû au niveau d'expression plutôt qu'au transgène lui-même. De plus, la tendance au niveau protéique est similaire avec ce que l'on apercevait au niveau de l'ARNm à savoir, une tau WT avec le plus fort niveau d'expression, puis la tau hypoP et enfin l'hyperP.

Ces résultats démontrent que nous avons pu mettre au point trois modèles de *C. elegans* transgéniques, exprimant dans des quantités relativement similaires, la protéine tau humaine. Une fois que les modèles ont été validés, nous avons cherché à savoir si nos nouvelles souches présentaient un quelconque phénotype permettant ainsi de déterminer quel degré de phosphorylation de la tau est nécessaire pour induire un effet toxique.

3.2 Caractérisation des modèles

3.2.1 La motilité des vers transgéniques

Les premiers tests effectués pour caractériser nos souches se sont basés sur la motilité du ver puisque l'expression de la protéine est localisée uniquement dans les motoneurones GABAergiques. En effet, si la tau est toxique, elle pourrait comme dans la maladie d'Alzheimer, induire une neurodégénérescence des neurones moteurs, conduisant à une perturbation dans la locomotion des nématodes. Il existe de nombreux tests pour examiner la mobilité du *C. elegans*, de ce fait nous en avons essayé plusieurs.

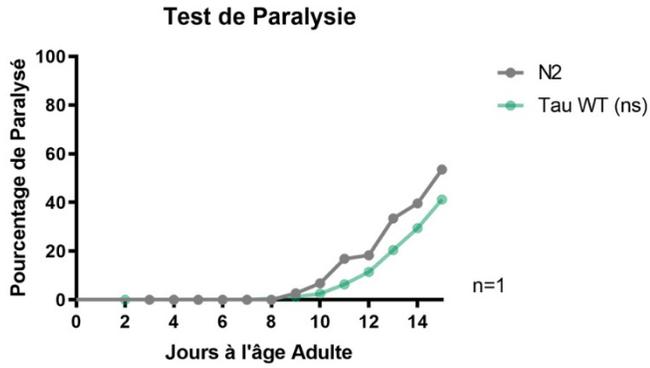
3.2.1.1 Test de Paralysie

L'expérience la plus classique dans le milieu du nématode est un test de paralysie. Le principe est de suivre pendant 15 jours à partir du stade adulte, plusieurs vers sur une plaque d'agar, et à tous les jours, de toucher doucement le vers avec un pic afin de provoquer un mouvement chez ce dernier. Ensuite, nous comptons le nombre de ver pouvant encore se déplacer au fil des jours en excluant les morts prématurées et nous pouvons obtenir un pourcentage du nombre de vers paralysés durant les deux semaines de suivis. Au-delà de 15 jours, cela perd de son intérêt puisque le ver est considéré comme très âgé, ne permettant donc pas la distinction entre l'incapacité de bouger à cause d'une neurodégénérescence prématurée ou du

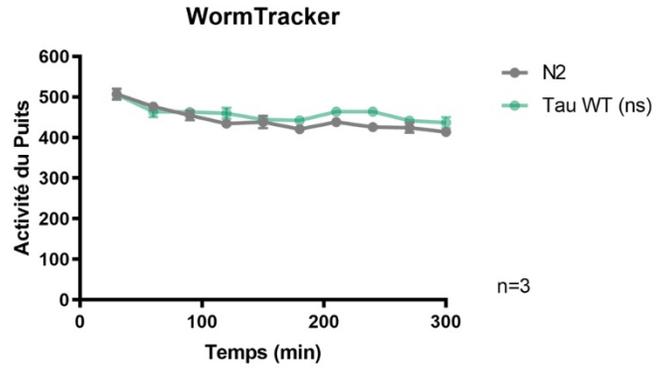
vieillesse normal de l'animal. Bien que les résultats montrés ne soit qu'un n = 1, cela représente 90 vers suivis pour chacune des souches ce qui nous donne un bon aperçu du phénotype. Nous avons pu voir que la souche tau WT ne présentait pas de différence significative comparée au contrôle (N2) et ce, pendant toute la durée des deux semaines (Figure 11A). De plus, nous pouvons observer que pour la souche hyperP, la paralysie débute au jour 9 et augmente fortement avec le temps, comparée au contrôle (Figure 11B). À 15 jours de suivi, nous avons observé plus de 60% de paralysie pour la souche hyperP comparé à 40% pour le contrôle. Surprenamment, la souche hypoP montre elle aussi une paralysie même si un peu moins prononcée que pour l'hyperP avec 58% contre 40% pour le contrôle (Figure 11C). Par ailleurs, la paralysie semble débiter un peu plus tôt que pour la souche hyperP (jour 8-9) mais commence à être significative par rapport au N2, plus tardivement comparé à la souche hyperP. Ces résultats préliminaires nous ont permis de situer le moment où le déficit en locomotion apparait pour chaque souche et suggèrent que l'induction de modifications des niveaux de phosphorylation de la tau serait toxique pour le *C. elegans*.

Figure 11 Schramm et col.

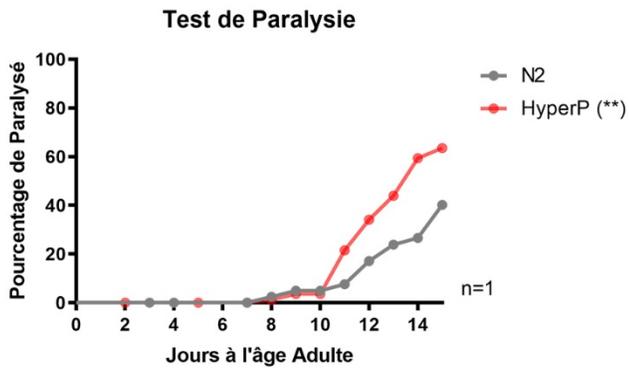
A



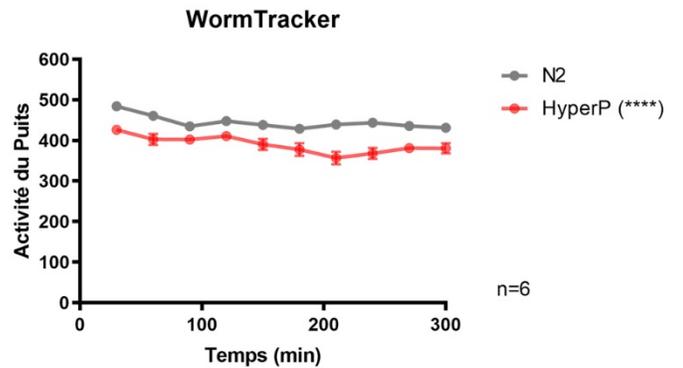
D



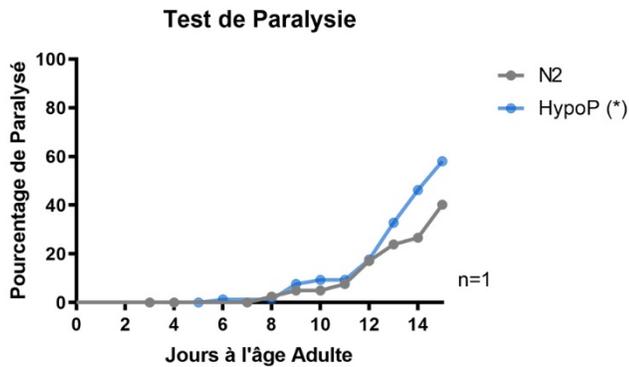
B



E



C



F

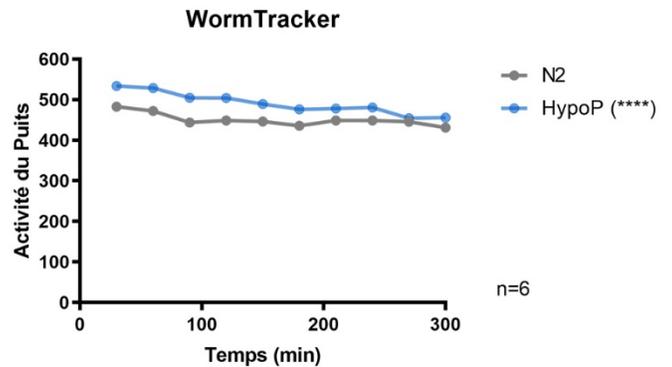


Figure 11. – Mesure de la motricité des souches transgéniques avec le logiciel WormTracker® et les tests de paralysie.

- (A) (B) et (C) Test de paralysie pour les souches tau WT, tau hyperP et tau hypoP respectivement. Un n représente 3 plaques contenant chacun 30 vers au départ. Les résultats ont été testés avec un test de survie (Survival Test) connu sous le nom de *Log-rank (Mantel-Cox) test*, ** p=0.0019. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne \pm d'une expérience indépendante.
- (D) (E) et (F) Utilisation du WormTracker® sur les souches WT, hyperP et hypoP respectivement. Un n représente 3 puits contenant chacun 30 vers. Les résultats ont été testés avec un *2way ANOVA*, **** p<0.0001. Les barres d'erreurs représentent la moyenne avec SEM. Pour la souche hyperP et hypoP, les résultats sont représentés comme étant la moyenne \pm de 6 expériences indépendantes. Pour la souche WT, les résultats sont représentés comme étant la moyenne \pm de 3 expériences indépendantes.

3.2.1.2 WormTracker®

Par la suite, même si le test de paralysie est reconnu dans le milieu scientifique, nous avons préféré changer d'expérience, d'une part pour confirmer ce que nous voyions à l'œil mais aussi pour nous affranchir de la subjectivité du test, puisque c'est à l'expérimentateur de décider si un ver est paralysé ou non. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser un logiciel nommé WormTracker®, capable de mesurer l'activité d'un puits rempli de *C. elegans* à l'aide d'un laser (Figure 11). En effet, le principe est de mettre un certain nombre de ver d'une même souche dans un puits avec 100 μ L de M9 (liquide) et de mesurer combien de fois les nématodes vont être détectés par le faisceau lorsqu'ils bougent. Par la suite, le logiciel va calculer l'activité moyenne de chaque puits au cours du temps et cela nous donne une idée de la motricité de chaque souche. Étant automatisée, cette expérience est plus reproductible qu'un test de paralysie et permet de détecter plus tôt de légères variations de vitesse indétectables pour l'œil humain. Nous pouvons observer que pour les vers tau WT, aucune différence de vitesse ne fût détectée, confirmant les résultats obtenus pour le test de paralysie (Figure 11D). Il en est de même pour la souche hyperP, présentant un déficit de motilité durant les 300 minutes de l'expérience, comparée au contrôle (Figure 11 E). Enfin, pour la tau hypoP, de façon surprenante, une augmentation de l'activité du

puits fût détectée comparée au contrôle (Figure 11F) suggérant une meilleure locomotion de cette souche par rapport aux N2.

Pour résumer, les résultats du Wormtracker® nous permettent de confirmer ceux obtenus avec le test de paralysie sauf pour la souche hypoP car nous avons observé une possible hyperactivité neuronale induite par la tau hypoP. Néanmoins, la faiblesse du test est que nous ne pouvons pas suivre des vers âgés puisqu'il est nécessaire d'avoir un certain nombre d'animaux dans les puits pour que le logiciel détecte une activité. Cependant, à partir du jour 5, garder en vie un grand nombre de vers malades constitue une limite. Pour étudier la motilité des vers tout au long de leur vie et en étant le plus standardisé et objectif possible, nous avons opté pour l'utilisation d'un autre logiciel nommé WormLab®.

3.2.1.3 WormLab®

Afin de déterminer précisément si cette perte de mobilité chez les souches transgéniques se ferait plutôt tardivement ou précocement, nous avons eu recours à l'utilisation d'un logiciel, nouveau dans le domaine du *C. elegans*, à savoir WormLab®. Ce logiciel permet contrairement à WormTracker®, de mesurer entre-autre, la locomotion de chaque vers séparément et cela à travers le temps, sans limite du nombre de vers utilisés. Pour ce qui est de la mise en place, nous utilisons un microscope à dissection équipé d'une caméra, nous permettant de prendre des vidéos de nos vers lorsqu'ils se déplacent. La vidéo étant prise, nous pouvons l'analyser avec le logiciel qui détecte chaque ver individuellement, et calcule de nombreux paramètres tels que la vitesse de nage. En effet, les vers que nous utilisons nageaient dans 100 µL de M9. En résumé, l'expérience consistait à mettre 30 vers sur une plaque présentant un petit cercle d'agar se situant au milieu de la plaque afin que ces derniers restent dans le champ de vision de la caméra. Ensuite, nous ajoutons 100 µL d'M9 afin de les obliger à bouger, puis nous prenons la vidéo de 30 secondes. Puis, cette vidéo était analysée par le logiciel, détectant la majeure partie des vers sur la plaque, et calculant ainsi différents paramètres que nous choissions par la suite selon leur pertinence.

Nous avons choisi différents jours dans la vie du *C. elegans* adulte, afin de déterminer si la toxicité de la protéine tau serait précoce ou plus tardive dans la vie de l'animal. Pour se faire, nous avons sélectionné les jours 1, 5, 9 et 13. Pour le jour 1, cela nous permet de savoir si le problème se déclenche rapidement au cours de la vie du ver, suggérant un problème lors du développement. De plus, avec le WormTracker®, nous avons vu des résultats intéressants dès le premier jour. Le jour 5 permet de voir si un problème pour l'une des souches se produirait vers la moitié de la vie active du ver puisqu'à partir du jour 12-15, le ver commence à être assez âgé et développe naturellement des problèmes moteurs imputés au vieillissement de l'animal. L'intérêt du jour 9 provient des résultats préliminaires obtenus par le test de paralysie, nous révélant le début d'un problème de motilité vers ce jour-ci. Enfin, le jour 13 permet d'avoir un spectre assez large du développement du phénotype et nous montre l'évolution de celui-ci dans des jours avancés pour l'animal

Pour le jour 1 (Figure 12A), nous retrouvons une vitesse plus importante pour la souche hypoP comparée au contrôle, confirmant les résultats observés avec le WormTracker®, et suggérant une hyperactivité neuronale nécessitant une tau hypoP. Pour la souche hyperP, là encore, comme avec le WormTracker®, la vitesse de cette dernière est bien inférieure au contrôle ainsi qu'à toutes les autres souches transgéniques, mettant en lumière la toxicité importante d'une protéine tau excessivement phosphorylée. De plus, cela suggère que les effets néfastes de cette protéine se produiraient rapidement lors du processus de développement du ver. Surprenamment la souche exprimant la protéine tau WT présente également une vitesse de nage accrue, résultats contradictoires avec ceux du WormTracker®. Cela peut s'expliquer car les deux logiciels ne mesurent pas la même chose. En effet, le WormTracker® mesure l'activité d'un puits contenant plusieurs vers qui vont être détectés par un faisceau lors de leurs mouvements répétés. Pour ce qui est de WormLab®, il détecte et mesure chaque ver individuellement, rendant plus précis l'analyse. Il se pourrait donc qu'avec le WormTracker®, on ne puisse pas détecter de façon aussi précise la vitesse de nage des vers, expliquant une moins grande significativité pour la souche hypoP comparée à WormLab®. Par ailleurs, on peut distinguer (Figure 11D) qu'à certains moments la souche a une plus grande activité par rapport au contrôle, et n'est jamais plus faible que ce dernier. De plus, le test statistique prend en compte l'activité des puits pendant les 5

heures d'expériences alors que le WormLab® lui, se base sur 30 secondes de vidéo uniquement. De ce fait, certains scores sont significativement plus élevés chez la tau WT comparée au contrôle mais sur l'ensemble des points cela ne l'est plus.

Figure 12 Schramm et col.

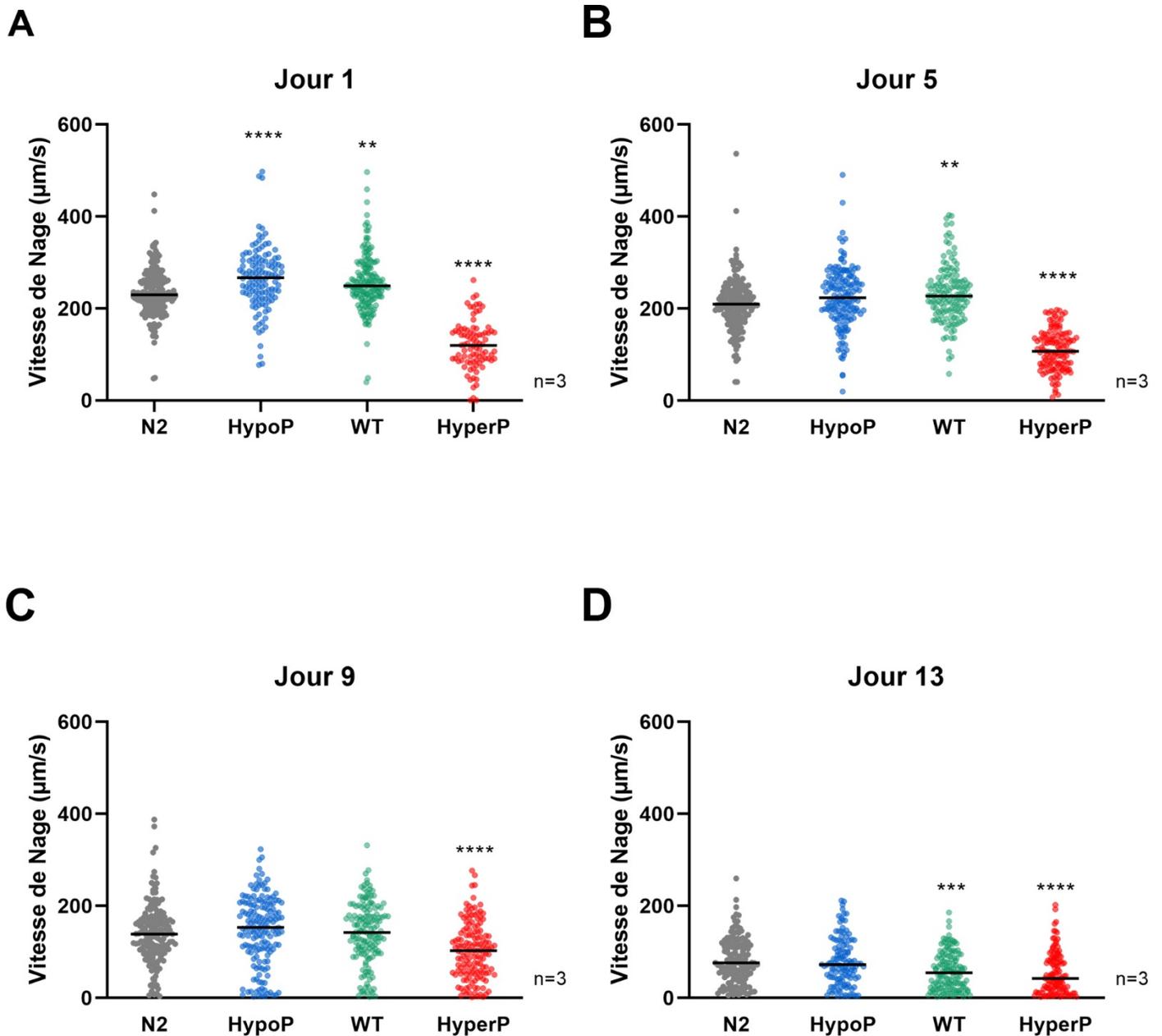


Figure 12. – Mesure de la vitesse de nage des souches transgéniques par le logiciel WormLab®

- (A) Vitesse de nage mesurée au jour 1, adulte pour les trois souches exprimant la tau humaine.
- (B) Vitesse de nage mesurée au jour 5 adulte pour les trois souches exprimant la tau humaine.
- (C) Vitesse de nage mesurée au jour 9 adulte pour les trois souches exprimant la tau humaine.
- (D) Vitesse de nage mesurée au jour 13 adulte. Diminution significative de la mobilité de toutes les souches due au vieillissement des animaux. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm de 3 expériences indépendantes. Chaque n représente 3 plaques contenant chacune 30 vers. Les résultats ont été testés par un *Ordinary one-way ANOVA* avec une correction de Dunnett, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ par rapport au contrôle (N2). Les barres noires représentent les médianes de chaque souche, c'est-à-dire là où se situe 50% des vers. Chaque point représente un ver détecté par le logiciel.

Pour les trois autres jours (Fig 12B, 12C et 12D), la souche hyperP continue à avoir une vitesse inférieure à tous les autres modèles. Pour la souche hypoP, à partir du jour 5, la potentielle hyperactivité décelée précédemment, n'est plus présente, suggérant un effet transitoire, se produisant au début de l'âge adulte. Enfin, pour la tau WT, on peut observer qu'au début de la vie des vers, la vitesse de ces derniers est supérieure à celle du contrôle. Puis à un stade plus avancé, lorsque les animaux sont plus âgés (jour 13), une certaine toxicité de la tau apparaît, se traduisant par une diminution prononcée de la vitesse de nage des nématodes.

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'en termes de toxicité, la protéine tau hyperP serait la plus nocive, puis viendrait le tour de la tau WT et pour finir la tau hypoP. Ceci est intéressant puisqu'on pourrait se dire que plus la tau est hyperphosphorylée, plus elle aura un effet toxique. Néanmoins, il est important de noter qu'avec ces résultats nous ne savons pas comment expliquer cette diminution de vitesse induite par l'expression de la tau humaine. L'hypothèse la plus probable est que, la protéine qui est exprimée uniquement dans les neurones moteurs, induirait leurs neurodégénérescences, expliquant le déficit de motricité des animaux. Afin de répondre à cette interrogation, nous avons voulu voir en microscopie, la morphologie des neurones moteurs pour les 3 souches transgéniques.

3.2.2 Neurodégénérescence des neurones moteurs dans les souches transgéniques

La prochaine étape était d'observer les motoneurones GABAergiques dans nos souches transgéniques afin de déterminer si le phénotype moteur que nous avons observé serait lié à une possible dégénérescence des neurones moteurs. Dans ce but, nous avons croisé nos souches transgéniques avec une souche exprimant une protéine fluorescente (*mCherry* = rouge) uniquement dans les neurones moteurs. Ce croisement était nécessaire afin d'observer les neurones en fluorescence puisque nos souches n'en n'ont aucune dans les cellules neuronales de base. Une fois le croisement effectué, il a fallu choisir un jour pour observer les vers. Suite à nos précédents résultats, nous avons au départ sélectionné le jour 9 adulte et ce pour plusieurs raisons. D'une part, c'est dans cette période de temps que la souche hyperP présente un déficit important dans la locomotion. De plus, nous avons préféré sélectionner un jour où les vers étaient assez âgés étant donné que s'il n'y avait pas de neurodégénérescence à ce stade-ci, il n'y en aurait pas aux stades plus précoces. Afin d'observer le système nerveux du *C. elegans* en microscopie à fluorescence, il a fallu trouver un moyen de les immobiliser sans les tuer ou détériorer le circuit neuronal. Pour ce faire, nous avons utilisé 5mM de levamisole, un dérivé synthétique de l'imidazothiazole, induisant chez le ver une hypercontraction des muscles sollicités dans la locomotion (Dent 2001). Il est à noter que ce produit est toxique pour le ver après 30 minutes d'utilisation, il est donc important que l'expérience ne dure pas plus d'une demi-heure, pour s'assurer que la neurodégénérescence que l'on observe n'est pas la conséquence de la drogue. Le levamisole va directement être absorbé par le ver, ne nécessitant donc pas d'injection au préalable. Les vers sont ensuite observés en microscopie à fluorescence à l'aide d'une lamelle de verre, et par la suite nous comptons le nombre d'animaux ayant soit sur leurs cordes ventrales, soit sur leurs cordes dorsales, un trou («*gap*») dans l'axone, signe de neurodégénérescence neuronale.

À jour 9, nous avons observé que seule la souche hyperP présente un nombre important de ver avec presque 60% de neurodégénérescence, comparé aux autres souches qu'elles soient transgéniques ou non (Figure 13A et 13B). Pour les autres souches transgéniques, que ce soit la tau hypoP ou WT, le nombre de ver présentant des «*gaps*» est similaire avec le contrôle (avec en moyenne 28% pour le contrôle, 22% pour l'hypoP et 26% pour la tau WT) renforçant les résultats obtenu avec WormLab® qui pour le même jour, montraient une vitesse similaire entre ces souches et le contrôle. Par ailleurs, la présence de quelques trous chez le contrôle s'explique car avec l'âge, il se produit de la neurodégénérescence induite par un vieillissement naturel de l'animal. Par la suite, nous avons regardé au jour 5 (Figure 13C et 13D), mais seulement pour la souche hyperP puisqu'étant la seule avec de la neurodégénérescence au jour 9. Là encore, nous avons observé une augmentation importante du nombre d'animaux ayant des *gaps* (55% versus 21% pour le contrôle) dans les motoneurons GABAergiques, corroborant la vitesse réduite de cette souche à jour 5 avec WormLab®. Pour finir, ces résultats nous ont permis de relier la perte de locomotion chez la souche hyperP avec la neurodégénérescence des neurones moteurs GABAergiques.

Figure 13 Schramm et col.

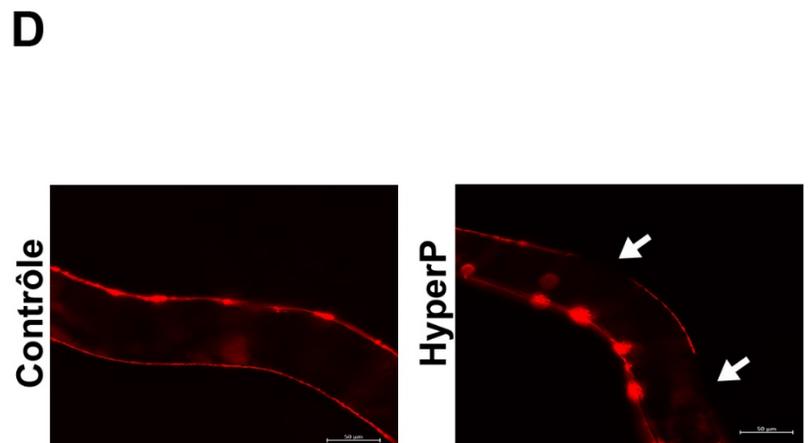
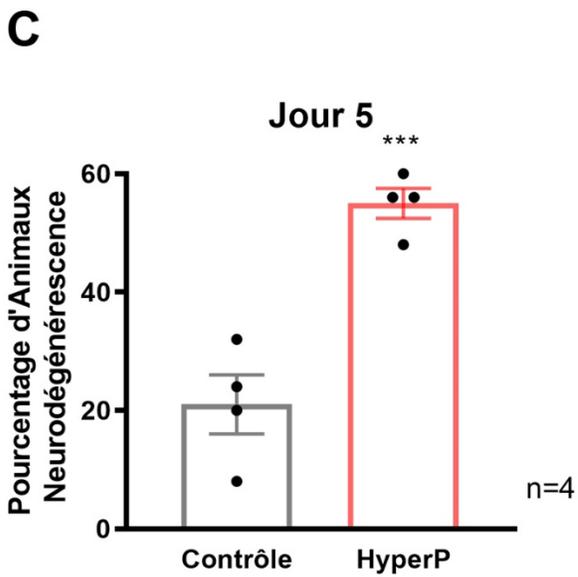
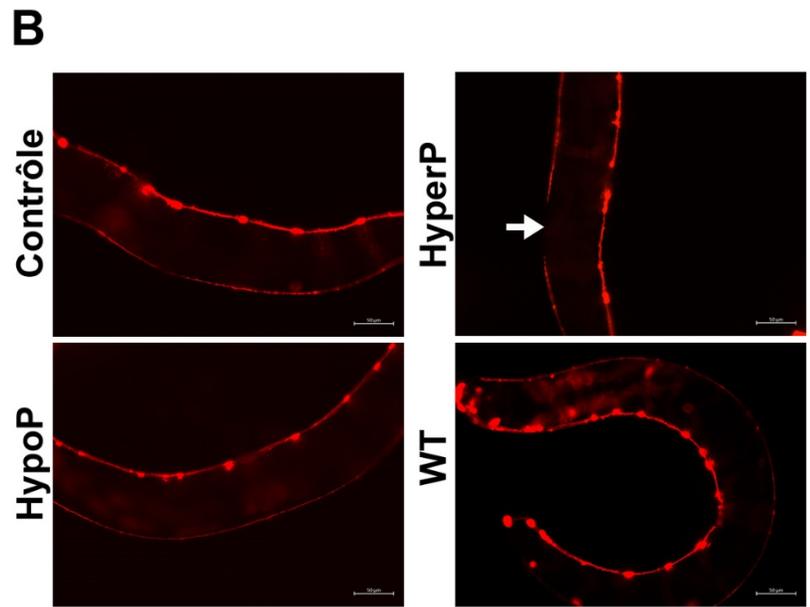
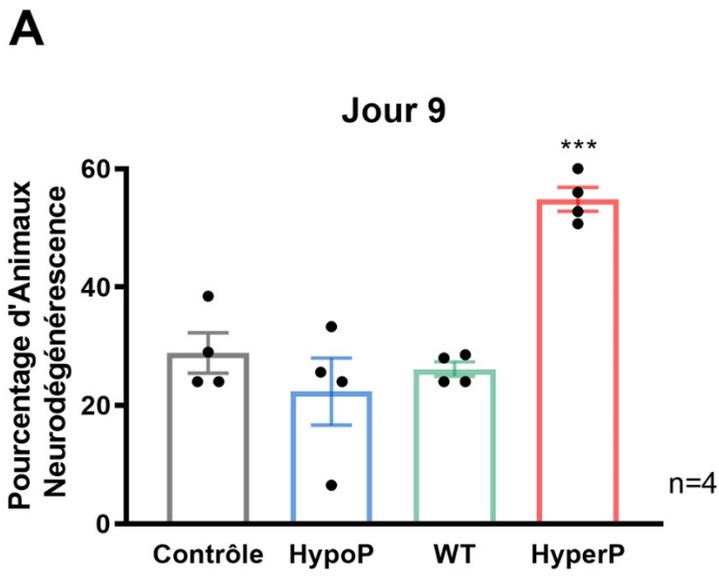


Figure 13. – Neurodégénérescence des neurones moteurs GABAergiques pour la souche hyperP aux jours 5 et 9 adulte.

- (A) Quantification en pourcentage pour chaque souche du nombre d'animaux présentant des *gaps* au niveau de leurs axones au jour 9 adulte. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm de 4 expériences indépendantes. Chaque n correspond à 25 animaux. Les résultats ont été testés par un *Ordinary one-way ANOVA* (Dunnett Test), *** $p=0.0006$. Les barres d'erreurs représentent la moyenne avec SEM.
- (B) Image de microscopie à fluorescence montrant l'expression du rapporteur *unc-47::mCherry* qui fluoresce en rouge les neurones moteurs GABAergiques se trouvant sur la corde dorsale et ventrale du *C. elegans*. La flèche blanche indique un *gap* se situant sur la corde dorsale de l'animal au jour 9 adulte.
- (C) Quantification du pourcentage d'animaux présentant un *gap* au niveau des neurones moteurs GABAergique au jour 5 adulte. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm de 4 expériences indépendantes. Les résultats ont été testés par un t test non pairé, *** $p=0.0009$. les barres d'erreurs représentent la moyenne avec SEM.
- (D) Image de microscopie à fluorescence du système moteur GABAergiques du *C.elegans* au jour 5 adulte. Les flèches blanches indiquent deux *gaps* se trouvant sur la corde dorsale de l'animal.

3.2.3 L'apparition de problèmes développementaux chez les souches transgéniques.

3.2.3.1 La souche exprimant la tau humaine hyperP possède une taille inférieure aux autres modèles

L'une des premières choses qui nous ait été de voir après la génération des souches transgéniques fût l'apparence étrange de l'une d'entre elle, à savoir la souche exprimant la tau hyperP. Effectivement, cette souche nous semblait visuellement plus petite que les autres et plus transparente (Figure 14A). Une fois que nous nous sommes assurés de l'existence d'un phénotype moteur, nous avons cherché à quantifier ce que nous voyons. Pour cela, nous avons encore une fois utilisé le logiciel WormLab® qui permet de calculer plusieurs paramètres, notamment la taille des vers. Le principe est un peu près le même que lorsque nous avons mesuré la vitesse de nage du ver à la différence que cette fois-ci, les vers se retrouvaient en culture solide, puisque nous n'avons aucun intérêt à les forcer à se déplacer. Pour l'expérience en elle-même nous avons sélectionné les 4 mêmes jours que pour le test de motricité à savoir le jour 1, 5, 9 et 13. Cette sélection nous permet de couvrir la majeure partie de la vie de l'animal et donc de suivre son évolution au cours du temps. Nous avons observé dès le premier jour et jusqu'au dernier que la souche exprimant la protéine tau hyperphosphorylée est plus petite que toutes les autres souches (Figure 14B, 14C, 14D et 14E). Par ailleurs, nos résultats montrent que cette souche est capable de croître au cours du temps mais sans jamais rattraper son retard de taille, suggérant que même si l'impact de la tau se fait précocement, son effet n'est pas réversible et perdure jusqu'à un stade avancé du ver, bien après le développement de celui-ci. Pour ce qui est de la souche hypoP, il semblerait que comme pour la motricité, cette tau n'aurait aucun effet délétère apparent. En ce qui concerne la tau WT, nous avons observé qu'à partir du jour 9 la taille du ver chute de façon significative sans jamais atteindre le même stade que la souche hyperP. Ce résultat semble confirmer notre hypothèse suggérant que la tau WT est elle aussi toxique pour le ver, mais lorsque ce dernier est âgé. De plus, elle semble moins néfaste que lorsqu'elle est hyperP, suggérant encore une fois que plus la protéine est phosphorylée plus sa toxicité augmente.

Figure 14 Schramm et col.

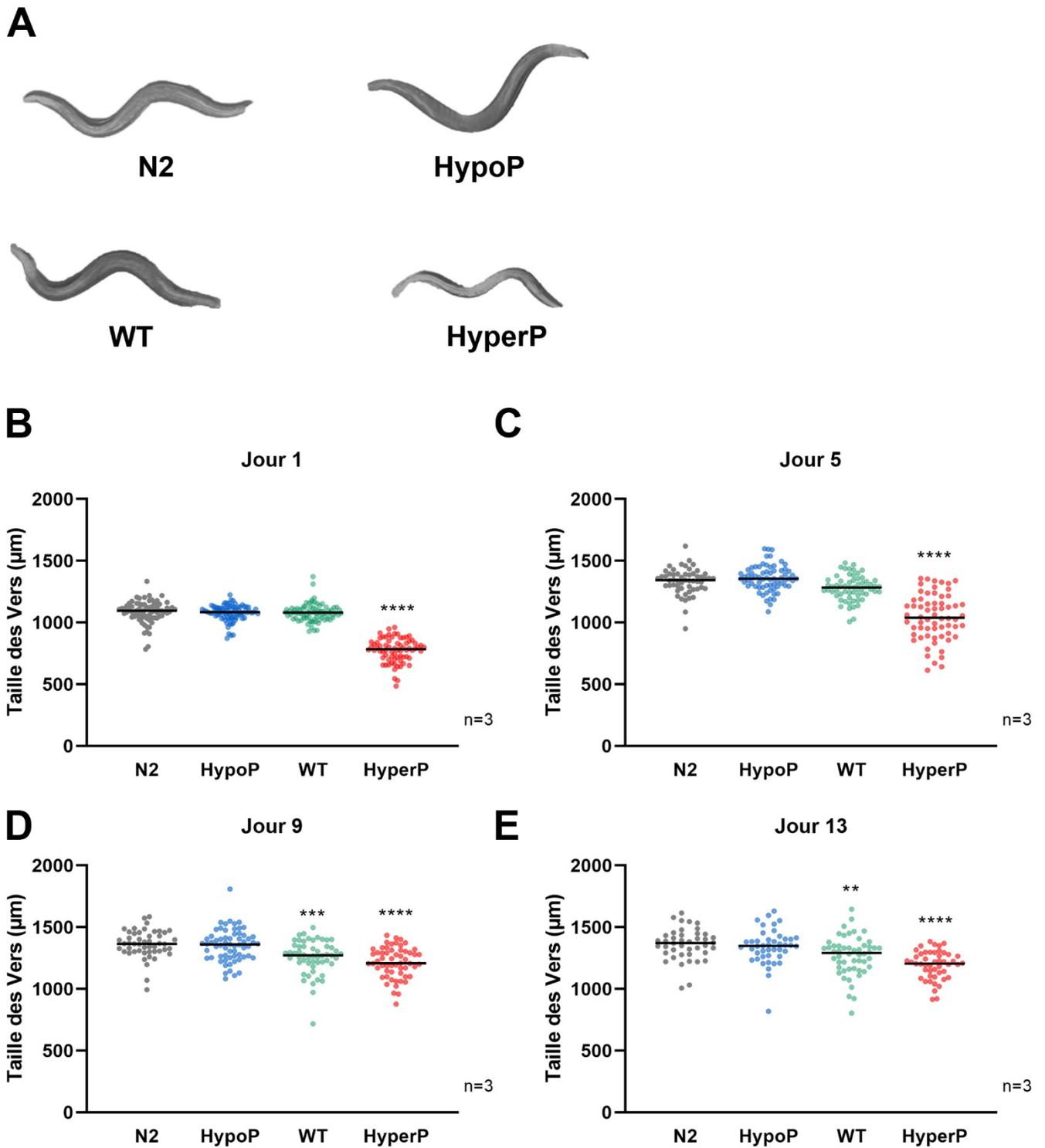


Figure 14. – La souche hyperP présente une perturbation au niveau de la taille des vers tout au long de la vie des animaux

- (A) Images de chaque souche prises avec un microscope à dissection muni d'une caméra (le Leica S9i) au même zoom. Les photos ont été prises au jour 1 adulte.
- (B) (C), (D) et (E) Quantification de la taille des vers pour chacune des souches transgéniques au jour 1, 5, 9 et 13. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm de 3 expériences indépendantes. Les résultats ont été calculés par un *Ordinary one-way ANOVA* avec une correction de Dunnett, **** $p < 0.0001$. Les barres noires représentent la médiane de chaque souche.

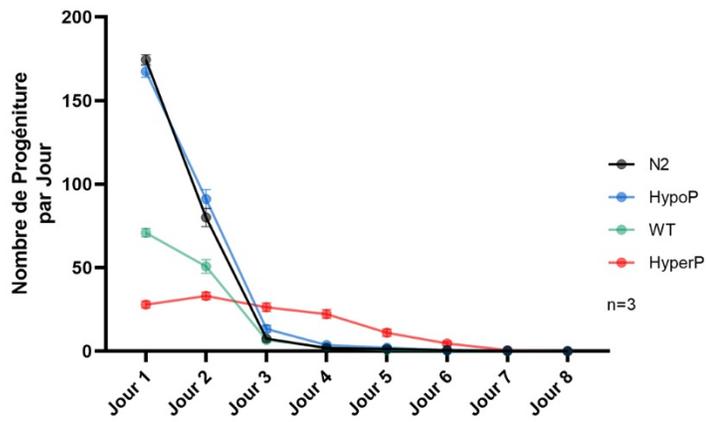
3.2.3.2 Les souches tau WT et tau hyperP pondent moins d'œufs que les autres, et possèdent une durée de vie légèrement raccourcie.

Outre la taille réduite observée chez la souche hyperP, un autre problème nous est apparu lors de nos nombreux tests. En effet, lorsque nous voulions obtenir un certain nombre de vers pour nos différentes expériences, nous nous sommes aperçus qu'il fallait mettre beaucoup plus d'hermaphrodites enceintes pour la souche hyperP afin de produire une quantité similaire de progénitures que pour les autres souches. Pour quantifier ce que nous voyons, nous avons opté pour un test de progéniture, inspiré d'un article de Hughes et al (Hughes, Evason et al. 2007). Le principe est simple, nous avons synchronisé des hermaphrodites jusqu'à ce qu'ils aient atteint le stade L4, stade précédent la ponte des œufs. Ensuite, nous avons disposé individuellement 10 de ces hermaphrodites sur des plaques vierges. Puis, nous avons transféré toutes les 24 heures les animaux sur de nouvelles plaques, afin de compter combien de descendants chaque souche de nématode pouvait pondre par jours. Pour finir, nous avons attendu 2-3 jours que les œufs des plaques éclosent et que la descendance grandisse jusqu'au stade L3-L4, ainsi il était plus aisé de compter les animaux. Enfin, nous avons exclu de nos résultats les œufs qui n'avaient pas éclos si tel était le cas, mais par chance jamais une telle chose n'est arrivée au cours de l'expérience. Nous avons suivi les vers du jour 1 adulte jusqu'au jour 8. Nous avons décidé d'arrêter l'expérience lorsque pendant 2 jours de suite, aucun œuf n'était pondu sur les 10 plaques, ainsi le jour 8 a été choisi. Par ailleurs, cela reste cohérent avec la littérature puisque les *C. elegans* sauvages pondent généralement pendant les 3-4 premiers jours, la majorité de leurs œufs (Fay 2006).

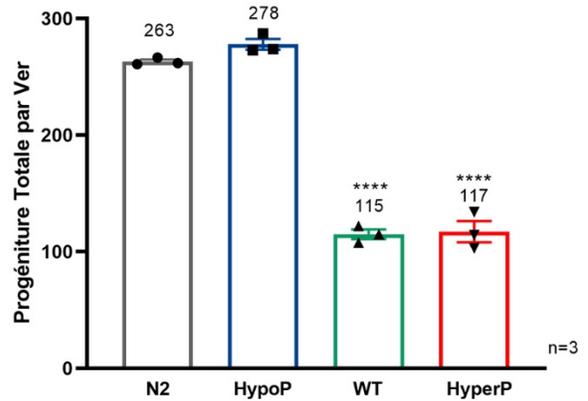
Premièrement, nous avons constaté que la souche hypoP comme le contrôle, pondent la majorité de leurs œufs du jour 1 jusqu'au jour 4, ce qui, encore une fois, est consistant avec la littérature (Figure 15A). Pour ce qui est de la souche hyperP, nous avons effectivement observé une diminution très importante du nombre de progéniture pondue chaque jour et ce, même pendant les 4 premiers jours qui normalement sont les moments principaux pour la ponte chez le *C. elegans*. Toutefois, il est important de remarquer que contrairement au contrôle et à la souche hypoP, la souche hyperP a continué à pondre un nombre certes limité d'œufs, mais constant jusqu'au jour 6 (Figure 15A). Avec ce résultat, nous pouvons dire que l'hyperP de la tau affecte grandement le délai de production et relargage des œufs mais nous ne pouvons pas savoir avec ce type de représentation graphique si le nombre d'œufs total est inférieur au souche en santé. C'est pourquoi nous avons fait une seconde représentation graphique où il est montré le nombre total de progéniture pondue par ver pour chaque souche (Figure 15B). Grâce à cela, nous avons pu voir que quand bien même la souche hyperP pondait sur une plus longue période de temps que le contrôle, il y avait une réduction significative du nombre de progéniture pour la tau hyperP comparée au contrôle ou à la souche hypoP. De façon surprenante, la souche tau WT présentait elle aussi un problème dans la production de progéniture. En effet, bien qu'elle a pondu plus d'œufs que la souche hyperP lors des deux premiers jours, on remarque une différence importante avec le contrôle ou la souche hypoP qui elles pondaient dès le premier jour, environ 180 vers alors que la tau WT n'est qu'à une soixantaine. Ce qui est intéressant c'est que la souche tau WT ne suit pas la même tendance que la tau hyperP en cela que la majeure partie des descendants sont relâchés les 4 premiers jours, comme le contrôle et la souche hypoP. Néanmoins, la souche tau WT pond le même nombre de progénitures que la souche hyperP, mais de façon différente, puisqu'elle va suivre la tendance des souches sauvage à savoir, relarguer la plus grande partie de sa descendance les 4 premiers jours, alors que la souche hyperP va quant à elle pondre moins d'œufs par jour mais sur une plus grande période de temps.

Figure 15 Schramm et col.

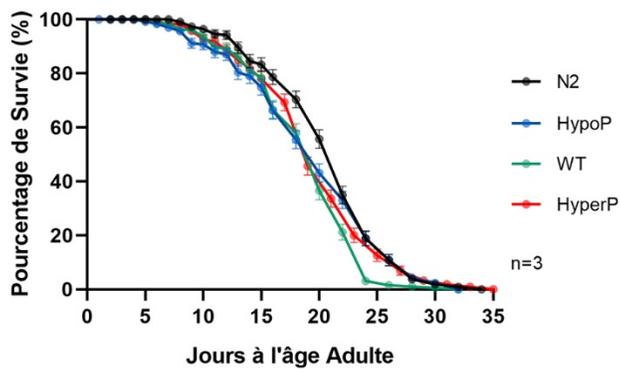
A



B



C



D

Résumé	N2	WT	HypoP	HyperP
# Sujets Exclus	56	75	57	53
# Morts	214	195	213	217
Vers Totaux	270	270	270	270
Médiane de Survie (Jour)	22	20	20	19

Figure 15. – La souche tau hyperP présente une diminution du nombre de progéniture ainsi qu’une durée de vie légèrement affectée.

- (A) Représentation graphique de la moyenne du nombre de progéniture pondue pour un ver chaque jour, pour chacune des souches. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm de 3 expériences indépendantes. Chaque n correspond à la moyenne du nombre de descendants générés par 10 vers, calculée pour chaque jour. Les barres d’erreurs représentent la moyenne avec SEM.
- (B) Quantification de la moyenne du nombre total de progéniture générée pour un ver durant toute sa vie. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm de 3 expériences indépendantes. Chaque n (point) correspond au nombre moyen total de descendant produit par 10 vers. Les résultats ont été testés avec un *Ordinary one-way ANOVA* avec une correction de Dunnett, **** $p < 0.0001$. Les barres d’erreurs représentent la moyenne avec SEM.
- (C) Test de *Life Span* pour chacune des trois souches transgéniques comparées au contrôle N2. La médiane de survie est de 22 jours pour le contrôle, 20 jours pour l’hypoP et la tau WT et 19 jours pour la souche hyperP. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm de 3 expériences indépendantes. Les barres d’erreurs représentent l’erreur standard (SE) du pourcentage de survie.
- (D) Tableau résumant les données du test de survie (*Life Span*). On peut voir le nombre de sujets exclus, c’est-à-dire ayant eu une mort non naturelle. Le nombre de mort est aussi représenté pour chacune des souches pour les 3 expériences. Le nombre total de vers est de 270, puisque chaque n correspond à 90 animaux. La médiane de survie correspond au jour où 50% de la population est morte.

Ces résultats indiquent que la tau WT et hyperP ont un effet néfaste sur un phénotype différent de la locomotion à savoir la production d’œufs. Toutefois, les deux souches ne vont pas induire leurs toxicités de la même façon. En effet, alors que la souche WT semble avoir un effet crucial lors des 4 premiers jours, sans changer le délai de ponte, la souche hyperP va elle, diminuer le nombre de nématode pondue par jour mais prolonger la période normale de ponte. Ce constat nous fait supposer que la tau humaine hyperP et WT induisent une perturbation sur le *C. elegans*,

confirmant ce que nous voyions avec le phénotype moteur au préalable, mais sur une voie biologique différente de la motricité, à savoir le développement de l'animal. La question de savoir comment une protéine n'étant exprimée que dans les neurones moteurs de l'animal puisse déclencher des problèmes dans d'autres voies biologiques reste entière.

Finalement, nous avons voulu déterminer si les effets toxiques de la tau hyperP auraient une répercussion sur la durée de vie de l'animal. Pour cela, nous avons fait un test de *Life Span*, très classique et reconnu dans les caractérisations de modèles *C. elegans*. Le principe du test consiste à suivre pendant toute la durée de vie des animaux, une trentaine d'individus, à tous les jours. Dans ce test, les vers mourants prématurément de causes non naturelles tel que les problèmes de ponte qui conduisent à l'éclosion des œufs à l'intérieur de l'animal, le tuant par conséquent sont exclus. De plus, il arrive que des vers «disparaissent» de la plaque, souvent la conséquence d'animaux s'aventurant sur les parois de la plaque, vierge de tout agar et conduisant l'animal à dessécher et mourir. À première vue, nous avons constaté très peu de différences entre les souches transgéniques et le contrôle (Figure 15C). Effectivement il semblerait que la toxicité de la tau n'ait pas une grande influence sur la durée de vie des nématodes. Par ailleurs, il est à noter que la médiane de survie des vers transgéniques est plus faible que le contrôle (jour 20 versus jour 22) (Figure 15D). Cette médiane donne la période pour laquelle 50% de la population est morte. De plus, il faut préciser que c'est la souche hyperP phosphorylé qui a la médiane la plus basse (jour 19), montrant là encore que même si l'effet est faible, il est plus important pour la souche hyperP. Toutefois, même si un effet néfaste sur la durée de vie des vers hyperP est révélé, nous ne pensons pas qu'il est assez significatif pour le prendre en considération et donc de conclure que la toxicité de la tau hyperP aurait un impact important sur la durée de vie des animaux. Il se pourrait aussi que l'expression du transgène soit responsable de cette diminution et que ce ne soit pas la tau en elle-même qui serait toxique mais que l'intégration d'un gène exogène aurait un léger impact sur la vitalité des animaux transgéniques. Il est important de préciser que sur le graphique la souche hyperP semble survivre plus longtemps que les autres (jusqu'au jour 35) (Figure 15C), or ce point représente un seul ver. Nous avons donc conclu qu'un ver sur les 270 étudiés n'est pas représentatif pour la souche hyperP, et par conséquent, ce n'était qu'une exception survenue qu'une seule fois lors de nos 3 expériences.

Pour finir, ces résultats montrent que la tau humaine quelque soit son degré de phosphorylation, n'est pas suffisante pour induire un effet conséquent sur la longévité de l'animal, ce qui dans notre cas est une bonne chose puisque dans un modèle d'Alzheimer, il est primordial que les animaux puissent vivre assez longtemps pour vieillir comme les patients. Finalement, l'ensemble de ces données nous ont montré que la tau hyperphosphorylée chez le *C. elegans*, induit des effets liés au développement de l'animal même si au départ, la protéine n'est uniquement exprimée que dans les neurones moteurs GABAergiques.

3.3 Découverte de drogues pour la protéine Tau

Une fois la caractérisation de nos souches terminée, nous avons réalisé un criblage de médicaments dans le but d'identifier quelques molécules intéressantes, permettant peut-être de distinguer des voies biologiques impliquées dans la toxicité de la protéine tau. Malheureusement, par manque de temps, nous n'avons pas pu faire un criblage à proprement parlé, avec des centaines de drogues testées. Toutefois, nous avons sélectionné 4 drogues utilisées sur des modèles de *C. elegans* soit exprimant une protéine tau humaine soit ayant les mêmes problèmes moteurs que nos souches.

La première se nomme l'acide tannique (TA), un composé de la famille des tannins, polyphénols d'origine végétale. Plusieurs articles rapportent les effets bénéfiques de l'acide tannique, notamment des propriétés anti-amyloïdogéniques (Ono, Hasegawa et al. 2004) et neuroprotectrices (Lopes, Schulman et al. 1999). Ce composé a été testé chez le *C. elegans* et montre des effets bénéfiques sur ce dernier dont le plus notable est l'extension de la longévité de l'animal. Dans l'article, la concentration optimale de la drogue est de 100 μM (Saul, Pietsch et al. 2010), de ce fait nous avons utilisé cette concentration pour nos souches.

La seconde drogue utilisée est l'azaperone, un antipsychotique butyrophénone. C'est un antagoniste des récepteurs D2 dopaminergiques, et chez des souches de *C. elegans* exprimant une tau humaine (T337) on observe une amélioration du phénotype moteur ainsi qu'une protection contre la neurodégénérescence des motoneurones GABAergiques (McCormick, Wheeler et al. 2013). La concentration utilisée dans cet article est de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La troisième est le curcumin, un polyphénol provenant d'un rhizome qui sert d'épice en Inde. Le curcumin est connu pour ses nombreuses propriétés bénéfiques, tel que les effets antioxydants et la réduction des plaques amyloïdes notamment. Il est utilisé dans un article sur une souche exprimant une tau humaine mutée (R406W) et permet notamment l'amélioration de la motilité des vers ainsi que les dysfonctionnements neuronaux et autres anomalies morphologiques (Miyasaka, Xie et al. 2016). Deux concentrations sont utilisées dans l'article, une faible dose (3 μM) et une forte dose (30 μM) ce qui correspond à 100 μg par plaque d'agar. Étant

donné qu'une plaque contient 8mL d'agar, nous avons choisi une concentration de 12.5µg/mL (100µg/8mL)

La dernière drogue sélectionnée est l'éthosuximide, un antiépileptique qui chez le ver régule à la hausse la voie DAF-16/FOXO c'est-à-dire la voie de l'insuline chez le *C. elegans* (Chen, McCue et al. 2015). Ce composé est utilisé sur des *C. elegans* exprimant une tau humaine (V337M = modèle de FTD). Il permet d'améliorer le phénotype moteur des vers, leur courte durée de vie et diminue le niveau de tau insoluble. La concentration utilisée est de 2 mg/mL, et c'est donc celle-ci que nous avons utilisé pour nos souches.

La méthode d'administration des drogues que nous avons choisie est d'ajouter le composé dans l'agar avant que celui-ci ne se solidifie (Zheng, Ding et al. 2013). Ensuite nous avons complété avec de l'OP50 (les bactéries) et puis avons placé les vers sur les plaques, qui ont absorbé la drogue par contact et en s'alimentant. Étant donné qu'aucune des drogues choisies n'est sensible à la température de l'agar encore chaud, nous avons pu utiliser cette méthode d'administration qui est l'une des moins contraignantes et des plus aisées. Nous avons exposé les animaux dès les stades larvaires, stades pendant lesquelles les vers sont plus sensibles à l'exposition des drogues, permettant une meilleure absorbance de celles-ci. Par la suite nous avons choisi de faire nos tests aux jours 5 et 9 adulte puisqu'à ces périodes nous avons observé des problèmes moteurs et nous voulions quelques jours de délai pour que les drogues puissent agir sur le phénotype moteur. Enfin, nous n'avons fait les tests qu'avec la souche hyperP pour des raisons de temps d'une part, mais aussi car c'est la seule avec un phénotype moteur à ces périodes données.

Pour ce qui est du curcumin tout d'abord, nous avons observé que ce soit au jour 5 ou 9 (Figure 16A), que la souche hyperP n'arrive pas à rattraper la vitesse de nage du contrôle. De plus aucune différence n'est révélée entre la souche hyperP avec ou sans la drogue. Par ailleurs, il semblerait que la souche contrôle a une vitesse supérieure avec la drogue que sans. Toutefois il est à noter que les résultats montrés avec les drogues ne sont que des n=1 comparés aux souches sans drogues qui elles sont les résultats n=3 obtenus précédemment. Nous avons conclu que le curcumin, pour cette concentration et pour ce phénotype, n'avait aucun effet significatif pour notre souche hyperP.

Figure 16 Schramm et col.

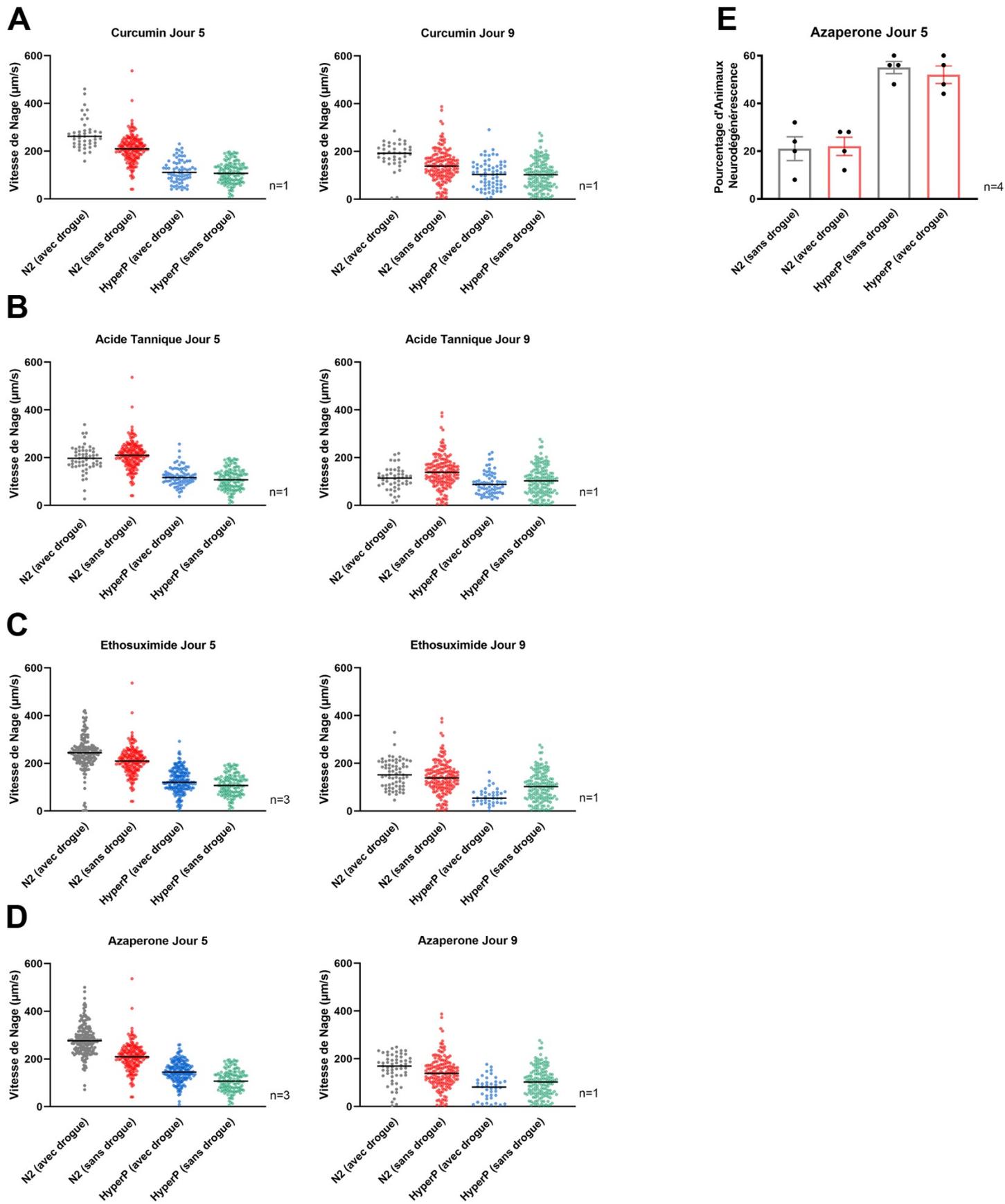


Figure 16. – Utilisation de 4 drogues visant à améliorer le phénotype moteur de la souche hyperP

- (A) Quantification de la vitesse de nage pour la souche hyperP et le contrôle aux jours 5 et 9 adulte. La quantification a été faite avec le logiciel WormLab®. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm d'une expérience indépendante.
- (B) Quantification de la vitesse de nage pour la souche hyperP et le contrôle aux jours 5 et 9 adulte. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm d'une expérience indépendante.
- (C) Quantification de la vitesse de nage pour la souche hyperP et le contrôle aux jours 5 et 9 adulte. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm d'une expérience indépendante (pour le jour 9) ou 3 expériences indépendantes (pour le jour 5).
- (D) Quantification de la vitesse de nage pour la souche hyperP et le contrôle aux jours 5 et 9 adulte. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm d'une expérience indépendante (pour le jour 9) ou 3 expériences indépendantes (pour le jour 5).
- (E) Quantification du pourcentage d'animaux présentant une neurodégénérescence dans les motoneurones GABAergiques au jour 5, traités ou non avec l'azaperone. Tous les résultats sont présentés comme la moyenne \pm de 4 expériences indépendantes. Chaque n correspond à 25 vers. Les résultats ont été testés par un *Ordinary two-way ANOVA*. Les barres d'erreurs représentent la moyenne avec SEM.

Le même constat a été fait avec l'acide tannique puisqu'aucune amélioration du phénotype moteur n'est à signaler pour la souche hyperP que ce soit au jour 5 ou 9 (Figure 16B). Néanmoins, il est à noter au jour 9, une légère diminution de la vitesse pour les deux souches lorsqu'elles ont la drogue comparée à lorsqu'elles ne l'ont pas. Nous pensons que cela est dû à une exposition trop prolongée du composé chez les vers, menant à un effet toxique.

Notre supposition est renforcée par le fait que pour les autres drogues, à savoir l'éthosuximide et l'azaperone, au jour 9 nous avons aussi vu un effet toxique significatif de la drogue mais cette fois-ci uniquement pour la souche hyperP (Figure 16C et Figure 16D). Le fait que dans ce cas, seule la souche hyperP ait été touchée peut s'expliquer par le fait que cette dernière est de base, plus sensible à une surexposition de drogue puisque malade (et donc

fragilisée) contrairement au contrôle. Toutefois, il est important de souligner qu'au jour 5, l'azaperone et l'éthosuximide augmentent la vitesse de nage des souches de façon aspécifique, puisque le contrôle aussi est affecté (Figure 16C et Figure 16D). De plus, les résultats pour ces deux drogues au jour 5 sont des n=3 car au départ, nous avons procédé à un n=1 pour les 4 drogues, et seules l'azaperone et l'éthosuximide ont montré des résultats préliminaires intéressants. De ce fait, nous avons voulu faire un n=3 pour voir si la tendance restait en augmentant le nombre d'individus.

En résumé, seules les drogues azaperone et éthosuximide montrent une amélioration du phénotype moteur mais de façon non spécifique au transgène, suggérant que la drogue n'agit pas par une voie biologique affectée spécifiquement par la tau hyperP. De plus, une exposition prolongée de ces drogues aurait l'effet inverse comme le montre les résultats au jour 9 adulte. C'est pour cela que nous n'avons fait des tests de neurodégénérescence qu'au jour 5 adulte par la suite. En effet, même si les deux drogues ne semblent pas être spécifiques au transgène, elles améliorent la vitesse de nage, ce qui est quand même un résultat bénéfique qui pourrait être dû à un effet neuroprotecteur des neurones moteurs GABAergiques.

Pour confirmer cela, nous avons opté pour un test de neurodégénérescence comme précédemment mais cette fois-ci avec les souches exposées aux drogues. Par ailleurs, nous n'avons testé que l'azaperone car c'est la drogue qui a l'effet le plus important sur les nématodes et donc, si aucune neuroprotection n'est décelée avec elle, il n'y en aura pas non plus avec l'éthosuximide.

Afin de déterminer si l'azaperone induisait un effet neuroprotecteur sur les neurones moteurs, traduisant ainsi l'augmentation de vitesse aperçu auparavant, nous avons regardé le pourcentage d'animaux ayant de la neurodégénérescence au jour 5 adulte, en comparant les souches exposées ou non à la drogue. Malheureusement aucune différence n'a été décelée avec ou sans la drogue (Figure 16E). De ce fait, l'amélioration du phénotype moteur produit par la drogue, n'est pas due à un effet neuroprotecteur de cette dernière. Nous avons alors décidé de ne pas faire de test pour l'éthosuximide, étant donné l'effet bien plus faible comparé à l'azaperone.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats nous ont permis de détecter deux drogues qui améliorent le phénotype de notre souche hyperP même si non spécifiques à celle-ci. Par ailleurs, ces drogues ne permettent pas un ralentissement de la neurodégénérescence induite par la protéine tau hyperP. Néanmoins, ces résultats avaient comme premier but de montrer le potentiel d'un criblage de médicament sur nos souches. En effet, si avec 4 drogues, 2 montrent des résultats certes discutables mais encourageants, le criblage d'une centaine voir de milliers de molécules aura une forte probabilité d'aboutir à la découverte de molécules intéressantes pour identifier et expliquer les voies impliquées dans la toxicité de la protéine tau.

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Un peu de contexte

Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine tau joue un rôle important dans la progression et la pathologie. De nombreux papiers mettent en lumière une protéine hyperphosphorylée, agrégée et toxique (Jouanne, Rault et al. 2017). De ce fait, il est devenu normal d'associer la toxicité de la protéine et sa phosphorylation excessive si bien que des thérapies se basaient sur ce principe (Churcher 2006). Néanmoins, d'autres résultats remettent en question cette théorie, comme le fait que des neurones puissent survivre plus de 20 ans avec des NFTs (Morsch, Simon et al. 1999) ou encore montrant le possible effet protecteur de ces filaments de tau phosphorylée (Castellani, Nunomura et al. 2008). À cela s'ajoute des preuves évoquant une toxicité d'une tau hypophosphorylée chez des modèles de Drosophiles (Talmat-Amar, Arribat et al. 2011). Dans ce mémoire, nous avons donc cherché à déterminer quel degré de phosphorylation de la tau est nécessaire pour sa toxicité. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé des modèles de *C. elegans*, utiles entre-autre pour la multitude de tests réalisables dont notamment le criblage de médicament.

4.2 La génération des souches transgéniques

Il existe déjà dans le domaine du *C. elegans* de nombreux modèles de tauopathies exprimant une tau humaine mutée (Pir, Choudhary et al. 2017). Néanmoins, aucun de ces modèles n'exprimaient une tau mimant une hypophosphorylation ayant une expression comparable à une tau hyperP (Brandt, Gergou et al. 2009). En effet, Roland Brandt dans son étude explique qu'il n'a pas pu tirer de conclusions sur sa souche hypoP étant donné que celle-ci avait un niveau d'expression bien plus élevé que celle du mutant tau hyperP. De ce fait, nous avons décidé de créer trois souches, l'une mimant l'hypoP, une autre mimant l'hyperP et une dernière exprimant une tau sauvage. En s'appuyant sur les phénotypes observés sur les autres modèles de tauopathies, nous avons décidé d'exprimer la protéine dans les motoneurones GABAergiques et uniquement dans ce groupe neuronal. La raison est que nous voulions limiter l'effet de surexpression que l'on peut avoir lorsque l'on exprime une protéine dans tous les types

neuronaux. De plus, le choix des motoneurons découle de la simplicité avec laquelle on peut observer un changement dans le phénotype du ver (le mouvement). Enfin, l'utilisation du *C. elegans* comme modèle est intéressant pour pouvoir observer l'effet de la protéine dans un organisme entier (*in vivo*) et la sélection de celui-ci plutôt qu'un autre s'explique par la simplicité avec laquelle nous pouvons faire un criblage de médicament ainsi que diverses expériences pour caractériser nos modèles. Pour finir, la combinaison de ces modèles transgéniques a permis de comparer les trois degrés de phosphorylation de la protéine, montrer quel niveau de phosphorylation est nécessaire pour que la tau soit toxique ainsi que mettre en avant de possibles voies biologiques par lesquelles la tau induirait sa toxicité dans le ver.

4.3 La vitesse des souches transgéniques

En utilisant trois tests différents mesurant la vitesse des vers, nous avons observé une nette diminution de la locomotion chez les souches hyperP comparé à toutes les autres souches (Figure 11 et 12) et ce, pendant toute la période de vie active du ver. Ces résultats suggèrent que l'hyperphosphorylation serait toxique pour la protéine et que plus la tau devient phosphorylée, plus sa toxicité est importante. Ces données concordent avec ce que l'on lit dans la littérature chez des modèles de *C.elegans* exprimant une tau humaine de façon *pan* neuronale. En effet, que ce soit la tau V337M ou P301L (Kraemer, Zhang et al. 2003), les animaux présentaient une déficience dans la locomotion accompagnée d'une dégénérescence des motoneurons GABAergiques, comme ce que nous avons vu (Figure 13) même si ces deux types de tau présentaient des mutations différentes des nôtres, ne mimant pas de phosphorylation.

4.3.1 WormTracker®

Une des limites rencontrée lorsque l'on travaille avec le *C.elegans* est l'accumulation rapide de mutation suite à un court cycle de reproduction. Or, il est convenu de par la vitesse importante de reproduction du *C. elegans*, de décongeler des souches fraîches (Ajie, Estes et al. 2005). En effet, au bout de 3-4 mois, les vers par leurs multiples reproductions, peuvent accumuler des mutations qui pourraient interférer dans le phénotype du ver (Estes, Phillips et al. 2004). Dans la figure 11, les résultats montrés, sont des n=3 ou 6, fait avec des vers adultes jour 1. Le fait que pour les souches hypoP et hyperP nous ne nous sommes pas arrêtés à un n=3,

s'explique parce que ces deux souches étaient intégrées avant le tau WT. Donc lorsque la souche tau WT fût terminée, il s'était écoulé plus de 3 mois entre l'intégration des souches hyperP et hypoP et celle-ci. C'est à ce moment-là que nous avons effectué nos n=3 pour toutes les souches en même temps. De ce fait, et pour s'assurer que ce que nous avons mesuré avec ces souches âgées de plus de 3 mois était dû au transgène et non pas à des mutations non désirées, nous avons recommencé un n=3 avec des souches hyperP et hypoP fraîchement décongelées. Enfin, puisque les résultats étaient identiques, nous avons décidé de regrouper les deux n=3 et donc d'avoir un n=6.

Par la suite, avec le WormTracker[®], nous avons mesuré une augmentation de l'activité du puits pour la souche hypoP comparée au contrôle. Cette différence avec le test de paralysie peut s'expliquer de plusieurs façons. Premièrement lors de ce test, les vers nagent pour se déplacer puisqu'ils se trouvent dans un milieu liquide alors que pour le test de paralysie ils sont sur une surface solide et rampent. De plus, le test du WormTracker[®] s'est fait avec des vers adultes âgés d'un jour seulement alors que la paralysie détectée pour ces vers s'est développée à partir du jour 9. Toutefois, cette hyperactivité de la souche hypoP est intéressante puisqu'il a été montré que dans les stades précoces d'Alzheimer, les neurones des patients étaient hyperactifs au départ, puis avec la progression de la maladie, l'activité diminuée (Haberman, Branch et al. 2017). Pour expliquer comment la tau hypoP chez le ver induit une hyperactivité neuronale, nous nous sommes basés sur ce que certaines études ont révélé (Wu, Hussaini et al. 2016). En effet, il a été démontré que lorsqu'on augmente l'activité neuronale, on observait une sécrétion de la protéine tau dans le milieu extracellulaire, qui de façon surprenante, est moins phosphorylée que la tau intracellulaire (Pooler, Phillips et al. 2013). Ces résultats suggèrent qu'une tau hypophosphorylée est sécrétée par des neurones lorsqu'ils sont trop stimulés. De ce fait, nous pouvons supposer que l'inverse peut être vrai aussi, à savoir qu'une tau hypophosphorylée provoquerait une activité accrue des neurones.

4.3.2 WormLab[®]

L'utilisation du logiciel WormLab[®] dans notre laboratoire étant récente, il a fallu tout d'abord optimiser le protocole pour quantifier la vitesse de nage. Le fait est que nous avons tout

d'abord essayé de laisser les *C. elegans* en milieu solide. Malheureusement nous ne pouvions pas détecter facilement le phénotype des vers à cause d'un biais important. Effectivement, les nématodes, lorsqu'ils se trouvent sur leurs nourritures (bactéries), ne bougent pas ou très peu puisqu'ils n'ont aucun intérêt à le faire étant donné que la nourriture est à leur portée. La différence entre ce test et celui de paralysie, se faisant lui aussi en culture solide est que lors de ce dernier, nous stimulons le ver en le touchant légèrement avec un pic. Or, comme nous prenons des vidéos, nous ne pouvons pas stimuler en même temps 30 vers sur une plaque pour qu'ils bougent lors de l'enregistrement. De ce fait, le logiciel calculait une vitesse similaire entre nos contrôles et nos souches transgéniques bien que ces derniers ne présentaient pas de problèmes moteurs mais tout simplement ne voulaient pas bouger (résultats non montrés). Nous avons donc cherché plusieurs moyens pour obliger les vers à bouger, tout d'abord en les exposants pendant quelques minutes à une température de 37°C, les excitants artificiellement (résultats non montrés). Bien que cela marchait fort bien, nous ne savions pas si la chaleur induisait un biais dans notre expérience. De plus, il a été montré qu'une exposition à la température induit une hyperactivité au niveau de la locomotion du *C. elegans* et cela persiste 20 minutes après une courte exposition à une température de 30°C. Par ailleurs, le comportement de l'animal est affecté et continue à se détériorer avec le temps (Parida, Neogi et al. 2014). Pour toutes ces raisons, nous avons opté pour la nage, car en effet, les nématodes, lorsqu'exposés à un liquide, sont obligés de nager sauf s'il leur en est impossible.

4.4 Test de Neurodégénérescence

Étant donné que notre souche hyperP a un déficit important dans la locomotion se traduisant par une vitesse de nage inférieure aux autres souches transgéniques ainsi qu'au contrôle, nous avons voulu savoir si cette baisse de vitesse avait pour cause une dégénérescence des neurones moteurs. En effet, dans les tauopathies, la toxicité de la protéine tau se traduit principalement par la dégénérescence neuronale. De ce fait, il nous a semblé normal de faire un test de neurodégénérescence dans le groupe de neurone où la protéine était initialement exprimée. Nous avons pu constater que la motilité réduite chez la souche hyperP avait pour origine un vieillissement prématuré des neurones induit par la tau phosphorylée. De plus, cela corrobore l'idée que la phosphorylation excessive de la protéine serait la plus préjudiciable, par

rapport à une tau WT ou hypoP. Nous avons choisi comme indicateur de neurodégénérescence la présence ou non de trou au niveau de l'axone des neurones que ce soit sur la corde ventrale ou dorsale de l'animal, technique utilisée pour caractériser la neurodégénérescence chez le *C. elegans* (Chen, Martinez-Finley et al. 2013). Contrairement à d'autres articles, nous n'avons pas choisi d'inclure en plus les changements morphologiques des axones, comme par exemple la présence de discontinuités le long de ces derniers. Cependant, nos résultats semblent concorder avec ceux d'autres études, ayant pour modèles des *C. elegans* exprimant une tau humaine mutée et toxique. En effet, pour le modèle exprimant la tau avec la mutation A152T (modèle PSP), dès le jour 3 adulte nous pouvons observer des trous au niveau de l'axone des neurones mécanosensoriels de l'animal (Pir, Choudhary et al. 2016). De plus, dans un modèle exprimant la tau V337M (modèle FTDP-17), la souche présente un déficit dans la locomotion ainsi qu'une dégénérescence des neurones moteurs GABAergiques (présence de trous aux niveaux des axones) (Kraemer, Zhang et al. 2003). Ces résultats démontrent que la protéine tau humaine a la capacité d'entraîner une neurodégénérescence des neurones chez le *C. elegans* et que cela a pour conséquence une diminution de leur locomotion confirmant ainsi notre hypothèse et nos résultats.

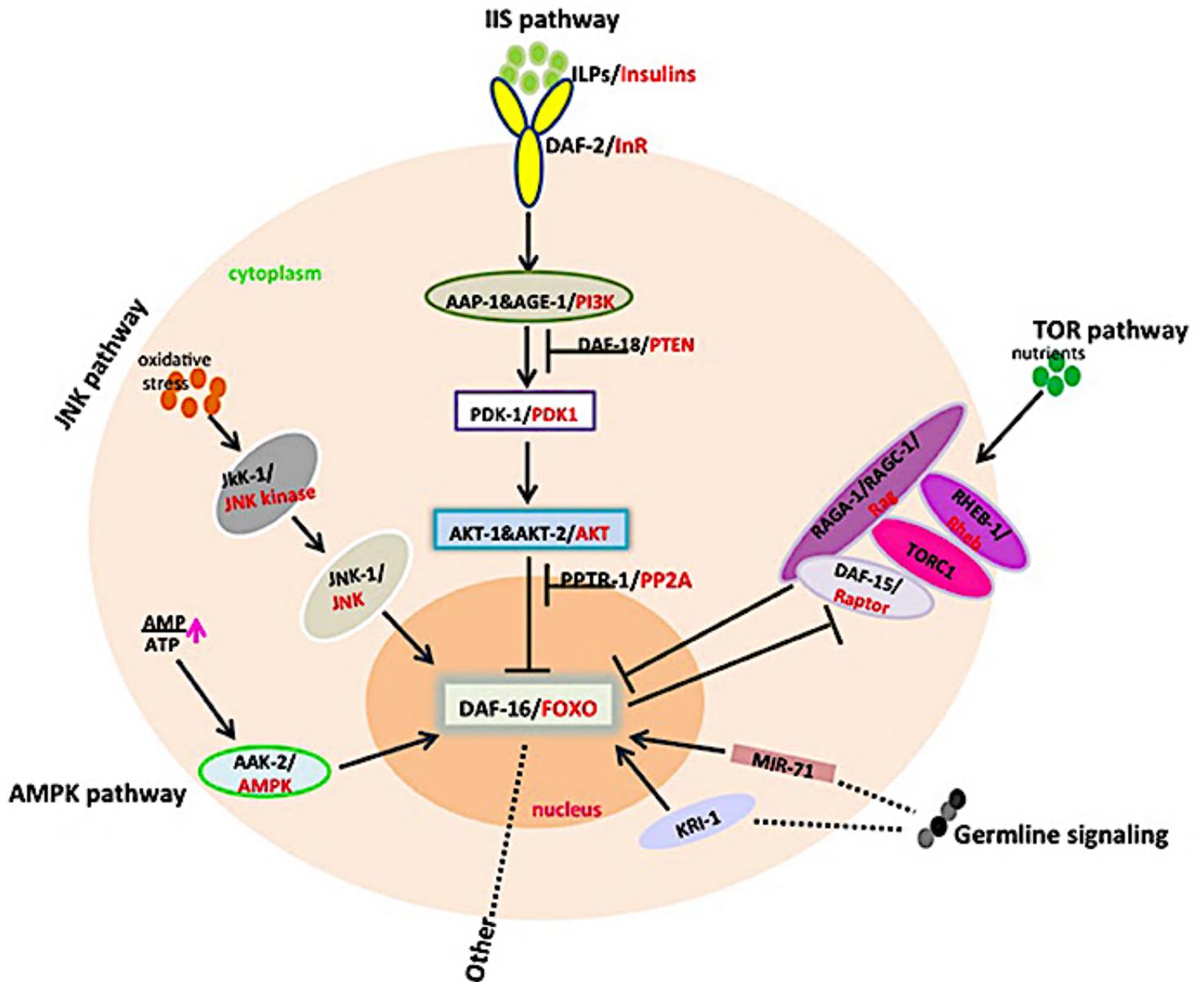
4.5 Les problèmes développementaux de nos souches et le potentiel lien avec l'insuline

La première chose que nous avons observé chez nos modèles est que la souche hyperP présente une taille réduite par rapport aux autres souches de *C. elegans* et qu'elle génère moins de descendances comparées à une souche sauvage. Il semblerait donc que la protéine tau hyperP aurait un impact sur des voies impliquées dans le développement de l'animal. L'une des principales voies est celle de l'insuline. Pour comprendre comment une protéine exprimée uniquement dans les neurones moteurs peut avoir un impact sur la voie de l'insuline il faut regarder dans la littérature.

4.5.1 La voie de l'insuline chez le *C.elegans*

Chez le *C. elegans*, la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 (Figure 17) (pour *insulin like growth factor*) (IIS) est impliquée dans le métabolisme de l'animal, sa croissance, son développement ainsi que sa longévité et son comportement (Murphy and Hu 2013). Cette voie est régulée par des ligands peptidiques analogues à l'insuline qui se lient à l'orthologue du récepteur transmembranaire de l'insuline DAF-2. Ce récepteur contrôle entre-autre l'activité d'une cascade de phosphorylation conservée PI3k (pour phosphoinositide 3-kinase) aboutissant à la régulation d'un facteur de transcription nommé Foxo/DAF-16 qui régit la plupart des fonctions de la voie de l'insuline. DAF-2 est le seul membre de la famille des récepteurs à l'insuline chez le *C. elegans* et la séquence protéique est identique à 34% à celle du récepteur de l'insuline IGF-1 chez l'homme qui régule la croissance (Ullrich, Gray et al. 1986). Contrairement à la plupart des eucaryotes où l'insuline active la signalisation, chez le *C. elegans*, l'insuline inhibe les récepteurs DAF-2, empêchant ainsi la phosphorylation de DAF-16 qui serait alors désactivé. Or DAF-16 est responsable de la régulation positive de la transcription de gènes codant pour des molécules protégeant les cellules contre le choc thermique ou le stress oxydatif notamment. De plus, il a un impact sur la longévité et le développement du ver comme le prouvent les mutants *daf-2* qui ont une expression continue de DAF-16, et une durée de vie doublée (Halaschek-Wiener, Khattri et al. 2005).

Figure 17. – Représentation schématique de la voie biologique de l'insuline chez le *C. elegans*.



Wang, YD. Et col, 2017, *Frontiers In Pharmacology*

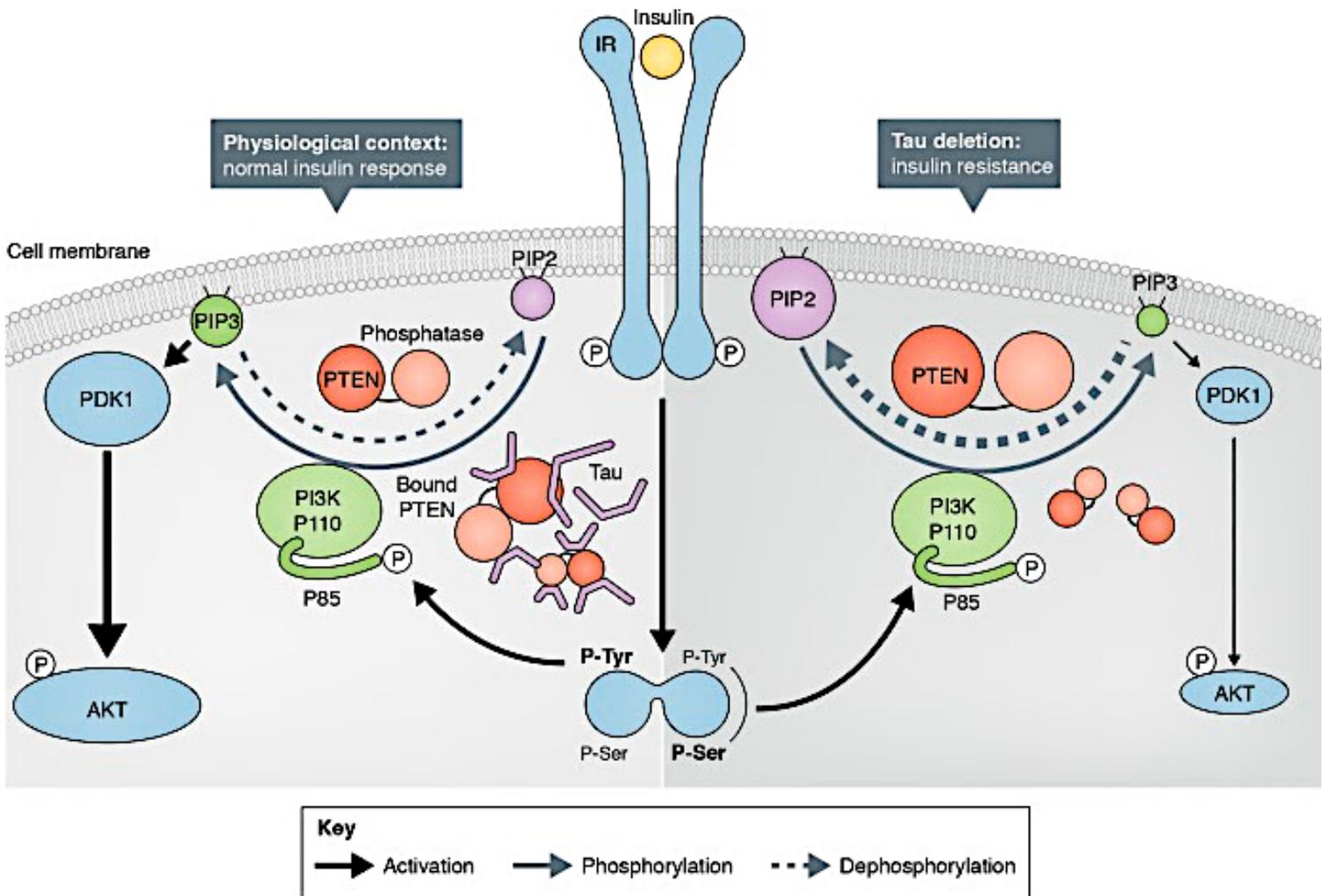
Légende : Représentation schématique de la voie de l'insuline chez le *C. elegans*. DAF-16/FOXO intègre plusieurs signaux provenant de différentes voies biologiques pour moduler la longévité et le vieillissement chez le nématode. Les molécules d'insuline vont se lier au récepteur DAF-2 induisant une activation de PI3P, entraînant une cascade de phosphorylation conduisant à l'activation de DAF-16/FOXO. Nucleus = Noyau, Pathway = voie biologique, Germline signaling =

Signalisation de la lignée germinale, Cytoplasm = cytoplasme, Nutrients = Nutriments, Oxidative Stress = stress oxydatif.

4.5.2 Le lien entre l'insuline et la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer

Les déficiences dans la signalisation de l'insuline ainsi que la résistance de cellules dans le cerveau de patients à l'insuline sont corrélés avec la progression de troubles neurodégénératifs telle que la maladie d'Alzheimer (diabète de type 3) (Watson and Craft 2003). En effet, le métabolisme de l'insuline aurait un rôle important dans le bon fonctionnement de la mémoire notamment (Morris and Burns 2012). De plus, les patients atteints d'Alzheimer ont des problèmes d'insuline à la fois en périphérie mais aussi au niveau central (de la Monte 2012). Des études scientifiques ont rapporté que les cerveaux Alzheimer auraient un métabolisme plus faible que les individus sains (Foster, Chase et al. 1983). Cet hypométabolisme a un impact important sur plusieurs régions cérébrales notamment l'hippocampe qui, chez des patients avec un Alzheimer léger, est hypoperfusé en insuline et ce déficit corrèle avec la sévérité des problèmes cognitifs (Rodriguez, Vitali et al. 2000). Une étude récente rapporte que l'insuline se retrouve retenue et s'accumule en tant qu'oligomère dans les neurones porteurs de tau hyperphosphorylée (Rodriguez-Rodriguez, Sandebring-Matton et al. 2017) dans la maladie d'Alzheimer (Marciniak, Leboucher et al. 2017). L'accumulation d'insuline par voie intraneuronale dépendrait directement de l'hyperP de la tau et suivrait l'évolution de la tauopathie. De plus, les cellules présentent des signes de résistance à l'insuline ainsi qu'une diminution de ses récepteurs. Suite à ces résultats, un modèle a été mis en place afin de tenter d'expliquer comment la tau interagirait avec la voie de l'insuline (Figure 18) (Gratuze and Planel 2017). Dans l'article, les chercheurs suggèrent qu'en conditions physiologiques, la protéine tau se lie à PTEN (pour *phosphatase and TENSin homolog*) (une lipide phosphatase), réduisant son activité et favorisant la formation de PIP3 (pour phosphatidylinositol triphosphate) plutôt que PIP2, permettant de poursuivre la voie de l'insuline, nécessaire à la plasticité cérébrale et l'homéostasie énergétique. Par ailleurs, en conditions pathologiques, lorsque la tau est perturbée, la protéine de signalisation IRS-1 (pour *insulin receptor substrate 1*) s'inactive en subissant une phosphorylation sur ses résidus sérine, et par conséquent réduit la réponse à l'insuline en augmentant le taux de PIP3 déphosphorylés (c'est-à-dire PIP2).

Figure 18. – Modèle de régulation de la signalisation de l'insuline par la protéine tau



Gratuze, M. et col, 2017, JEM

Légende : En condition physiologique (à gauche), une fraction de la protéine tau se lie à une partie de PTEN, réduisant son activité lipidique phosphatase et favorisant ainsi la formation de PtdIns (3,4,5) P3 par rapport à PtdIns (4,5) P2. En condition pathologique (à droite), deux mécanismes se produisent simultanément. Tout d'abord, l'IRS-1 subit une phosphorylation de ses résidus sérines ainsi qu'une réduction de la phosphorylation de ses tyrosines, entraînant son inactivation. Puis la réduction de la protéine tau disponible atténue l'inhibition exercée par PTEN, augmentant ainsi le taux de PIP2 par rapport à PIP3, réduisant ainsi la réponse à l'insuline.

4.5.3 Le possible lien entre la protéine tau et l'insuline dans notre souche hyperP.

En regardant dans la littérature, nous pouvons faire un lien intéressant entre la protéine tau et la voie de l'insuline. Pour expliquer les problèmes développementaux de notre souche hyperP, nous avons émis comme hypothèse que la tau hyperP va interagir en amont de la voie de l'insuline, par exemple avec le récepteur DAF-2 chez le *C. elegans* en l'activant ou encore en interagissant avec l'insuline, l'empêchant ainsi de se fixer sur le récepteur DAF-2, perturbant ainsi la voie et provoquant les perturbations développementales observées comme la petite taille ou le nombre de descendances produit. Cette supposition se base sur le fait que l'on connaît le rôle de PTL-1, (c'est-à-dire la tau endogène chez le *C. elegans*) qui est de réguler le vieillissement neuronal ainsi que la durée de vie du ver (Chew, Fan et al. 2013). En effet, une étude a observé l'impact de mutations dans PTL-1 au niveau des neurones GABAergiques du *C. elegans* notamment (Chew, Fan et al. 2013). Dans cet article, ils ont tronqué le domaine de liaison aux microtubules de la protéine, l'empêchant ainsi d'assurer sa fonction biologique. Ce qui est intéressant, c'est qu'ils ont observé une diminution de la durée de vie de plus de 37% chez les mutants comparés au contrôle sain. Cela suggère que la protéine tau chez le ver (PTL-1), qui est spécifique aux neurones, régulerait le vieillissement de tout l'organisme. Par ailleurs, il n'est pas surprenant qu'un petit groupe de neurone affectent la voie de signalisation de l'insuline ou du moins le développement du *C. elegans* (Frakes, Metcalf et al. 2020). En effet, certaines études ont montré que lorsqu'on pratiquait une ablation de certains groupes neuronaux (exemple : les neurones olfactifs, gustatifs), cela affectait la durée de vie de l'animal (Alcedo and Kenyon 2004). Cela montre l'importance des neurones dans la régulation de la durée de vie du *C. elegans*, et l'activité de la tau endogène chez le ver aurait un impact sur sa longévité.

Par ailleurs étant donné que la protéine est initialement exprimée dans les motoneurones GABAergiques, il semblerait que cette dernière ne reste pas cloisonnée à cette population de neurones et se propage sans doute mais cela reste à prouver.

4.6 La protéine tau n'affecte pas ou peu la durée de vie des vers

Déterminer si le transgène que l'on exprime impact sur la vitalité de nos modèles est courant dans les articles scientifiques visant à caractériser une nouvelle souche de *C. elegans*. Dans notre cas, la durée de vie des vers transgéniques est légèrement impactée par la protéine tau en déplacement la médiane de survivabilité quelques jours plus tôt. Néanmoins, nous n'avons pas observé une forte diminution de la durée de vie des vers comme pour le modèle A152T où les animaux présentaient une réduction de leur durée de vie entre 45% et 65% comparée au contrôle (Pir, Choudhary et al. 2016). Dans un autre modèle exprimant à la fois le peptide A β et une tau pro aggrégante, la durée de vie était significativement réduite par rapport au N2 (Wang, Saar et al. 2018). Le fait que dans nos modèles la toxicité de la protéine tau n'influence pas ou très peu l'espérance de vie des nématodes suggèrent une toxicité moins globale et généralisée. Cela peut s'expliquer puisque la protéine n'est pas exprimée dans tous les neurones de l'animal, permettant ainsi d'avoir un modèle capable de vieillir assez longtemps pour observer de la neurodégénérescence à un stade se rapprochant de celui des patients atteints d'Alzheimer. En effet, la maladie d'Alzheimer provoque une neurodégénérescence progressive qui commence à un âge avancé. Or notre modèle commence à avoir de la neurodégénérescence à un stade significatif de sa vie contrairement à d'autres modèles avec une maladie plus agressive et des symptômes apparaissant au début de leur vie. Néanmoins, il peut paraître surprenant que la protéine tau hyperP affecte si peu la durée de vie du ver alors que pour expliquer les problèmes développementaux nous avons suggéré précédemment que la tau interagirait avec la voie de l'insuline. Pour expliquer cela, il faut comprendre que la voie de l'insuline est primordiale pour la croissance du ver et donc son passage aux différents stades larvaires (Schindler, Baugh et al. 2014). Par ailleurs, pour ce qui est de la longévité, il est vrai que la voie de l'insuline joue un rôle dans la durée de vie de l'animal par l'activation de DAF-16. Néanmoins, il a été montré qu'il existe de nombreuses autres voies interagissant avec celle de l'insuline, contrôlant également la longévité chez le *C. elegans*. En effet, l'activation par exemple de la signalisation JNK conduit à l'activation de DAF-16 et à l'augmentation de la durée de vie du ver (Oh, Mukhopadhyay et al. 2005). De plus, d'autres gènes régulant la longévité ont été identifiés comme par exemple HSF-1 (pour Heat-

Shock factor-1) (Morley and Morimoto 2004), SIRT1 (Wood, Rogina et al. 2004), ou encore daf-15, une sous unité de la voie TOR (Jia, Chen et al. 2004). Il est donc raisonnable de penser qu'il se pourrait que d'autres voies puissent compenser le déficit en amont de la voie de signalisation de l'insuline, ce qui expliquerait pourquoi nos vers hyperP présentent peu de problème au niveau de leur durée de vie.

4.7 La question de l'agrégation dans notre souche hyperP

La protéine tau dans la maladie d'Alzheimer est hyperphosphorylée et se retrouve agrégée sous forme de NFTs. Étant donné que notre souche hyperP est celle ayant le plus fort phénotype, une des interrogations que nous avions était de savoir si cette protéine phosphorylée à l'excès était toxique sous une forme agrégée. Pour ce faire, nous avons tenté plusieurs méthodes mais malheureusement, aucune d'entre elles n'a fonctionné. Premièrement, nous avons opté pour un *Filter Trap Assay* (résultats non montrés), technique consistant à faire passer les protéines à travers un filtre, récupérer les agrégats sur une membrane de nitrocellulose, puis révéler à l'aide d'AC. Cependant, dans notre cas, nous avons aussi un signal d'agrégats dans notre contrôle où normalement l'AC spécifique pour la tau humaine ne devrait pas en détecter. Néanmoins, les AC ne sont pas très spécifiques dans le *C. elegans* et ils détectent souvent de nombreuses bandes aspécifiques. Là où dans un Western Blot classique, cela ne pose pas de problème puisque les protéines sont séparées par leur taille, avec la technique de *Filter Trap*, les protéines sont toutes regroupées sur un point central, et donc aucune séparation n'est possible. De ce fait, les bandes aspécifiques se confondent avec les bandes de la tau humaine et c'est pourquoi même en utilisant un AC dirigé spécifiquement contre une tau humaine, on détecte un signal dans le contrôle non transgénique.

Par la suite, nous avons opté pour une technique bien plus répandue dans le modèle du *C. elegans* à savoir faire un Western Blot classique mais en ne faisant migrer que des protéines agrégées (Kraemer, Zhang et al. 2003). Pour ce faire, lors de l'extraction des protéines, en utilisant différents tampons avec une stringence croissante, il est possible de séparer les protéines solubles et les insolubles. En ayant suivi le protocole de Mandelkowitz et al. (2016) (Pir, Choudhary et al. 2016), nous avons rencontré de nombreuses difficultés lors de l'extraction, que ce soit lors

de la sonication ou le dosage des protéines. De ce fait, nous n'arrivons pas encore à obtenir des bons résultats (résultats non montrés). Par manque de temps, nous n'avons pas pu répondre à la question de l'agrégation dans ce mémoire mais cela reste une de nos priorités absolues pour une éventuelle publication de nos recherches. En effet, il serait intéressant de savoir si la toxicité de notre tau hyperP serait due à une forme agrégée de la protéine. De ce fait, nous pourrions utiliser des drogues afin de déterminer si cela améliore ou non le phénotype de nos vers et donc de savoir si l'agrégation est la principale cause de toxicité de la protéine tau.

Toutefois, nous pouvons tenter de répondre à cette question, à savoir si notre souche hyperP présenterait ou non de la tau agrégée. En effet, lorsqu'on a utilisé des drogues sur nos vers, parmi celles choisies il y en avait deux qui sont connues pour avoir des propriétés anti-agrégantes, l'éthosuximide et l'azaperone (McCormick, Wheeler et al. 2013) (Chen, McCue et al. 2015). Dans les articles dont nous nous sommes inspirés, les chercheurs ont montré que dans leurs modèles de *C. elegans*, l'ajout de ces drogues permettait une neuroprotection contre la protéine tau au niveau des neurones GABAergiques (pour l'azaperone). De plus, ils ont montré une diminution significative du niveau d'agrégation de la tau (pour l'azaperone et l'éthosuximide). De plus, nous avons utilisé les mêmes concentrations en drogue que dans les articles originaux sur un modèle de *C. elegans* exprimant lui aussi une protéine tau humaine. Par ailleurs, contrairement à eux (McCormick, Wheeler et al. 2013), nous n'avons pas vu une amélioration par rapport à la dégénérescence des neurones moteurs. De ce fait, nous pouvons supposer que la protéine tau hyperP, dans notre modèle n'est pas agrégée, suggérant que la toxicité de la protéine ne serait pas due à l'agrégation, corroborant ainsi d'autres études allant dans ce sens.

4.8 Perspectives Futures

L'un des principaux objectifs pour notre laboratoire sera de déterminer si la protéine tau hyperphosphorylée est agrégée dans notre modèle de *C. elegans*. En effet, cela permettra de déterminer si sa toxicité proviendrait de l'agrégation ou si au contraire elle ne l'est pas. De ce fait, nous pourrions utiliser des drogues pro et anti-agrégante pour observer leurs impacts sur le phénotype de la souche, si elles aggravent ou améliorent la vitalité des nématodes. Pour ce faire, il nous faudra soit optimiser le protocole d'extraction des protéines insolubles dans le *C. elegans*,

ou bien utiliser un kit HTRF capable de détecter les potentiels agrégats de tau dans notre souche hyperP à l'aide d'AC dirigés contre la protéine tau humaine agrégée (Dehdashti, Zheng et al. 2013).

En parallèle, nous tenterons de répondre à notre hypothèse concernant le problème de taille chez notre souche hyperP, à savoir que la protéine tau hyperP aurait un impact sur la voie de l'insuline chez le *C. elegans*. Dans cette optique, nous effectuerons un croisement entre notre souche hyperP et la souche mutante pour *daf-2* présentant une activation continue de la voie de l'insuline (Mack, Zhang et al. 2017). Si le croisement permet une amélioration du phénotype, cela nous conforterait dans notre hypothèse. De plus, même si le croisement ne donnait rien, nous pourrions induire des mutations aléatoires (Lehrbach, Ji et al. 2017) dans le génome de nos souche transgéniques hyperP grâce à un mutagène nommé EMS (pour ethyl methanesulfonate). Ensuite, nous sélectionnerons les souches présentant une amélioration au niveau du développement du ver (taille par exemple) et nous séquencerons leur génome afin d'identifier les gènes mutés qui sont impliqués.

De plus, il ne faut pas oublier que dans nos 3 modèles transgéniques, nous n'avons pas empêché l'expression de la protéine tau endogène à savoir PTL-1. Cela est aussi une limite de nos modèles puisque la présence de la tau endogène peut venir compenser les effets néfastes de la protéine humaine, et donc masquer ou diminuer le phénotype de nos souches. Une des façons de pallier à cette limite serait de croiser nos souches transgéniques avec des souches KO pour PTL-1, souches que nous avons déjà dans notre laboratoire.

Enfin, la finalité de nos souches transgéniques est de faire un criblage de médicaments afin d'identifier des molécules ayant un effet positif ou négatif sur nos modèles, permettant ainsi de distinguer les voies biologiques impliquées dans la toxicité de la protéine (Hunt 2017). Par la suite, nous essayerons de transposer ce que l'on observe chez le *C. elegans*, dans des fibroblastes de patients atteints d'Alzheimer différenciés en neurones et ainsi découvrir des molécules pouvant améliorer les effets de la maladie chez l'homme.

4.9 Conclusion

Notre étude a permis de confirmer que la protéine tau hyperphosphorylée est toxique dans un modèle *in vivo* de *C. elegans*, comparée à une tau hypophosphorylée qui semblerait avoir un impact bien moins important sur le phénotype du ver comme le montre d'autres études sur des modèles de Drosophiles (Talmat-Amar, Arribat et al. 2011). De plus, la toxicité de cette protéine s'établit dans plusieurs voies biologiques distinctes même si la protéine est initialement localisée dans les neurones moteurs de l'animal. En effet, une perturbation du système locomoteur a été décelée dans la souche exprimant une tau hyperphosphorylée, provoquée par la neurodégénérescence des neurones GABAergiques. Ces données confirment ce que plusieurs autres études démontrent dans d'autres modèles, à savoir que la phosphorylation excessive de la protéine entraîne une toxicité chez cette dernière (Naseri, Wang et al. 2019). Par ailleurs et de façon surprenante, la protéine tau a également un impact sur le développement du nématode, passant peut-être par la voie de l'insuline. Ces résultats semblent concorder avec des articles précédents, évoquant un lien entre la protéine tau hyperP et l'insuline dans la maladie d'Alzheimer (Goncalves, Wijesekara et al. 2019). Pour finir, la génération de ces modèles est intéressante pour de futures applications thérapeutiques étant donné la facilité avec laquelle un criblage de plusieurs milliers de molécules peut être fait. De plus, l'importance de modèles tel que le *C. elegans* a déjà été prouvée dans notre laboratoire puisqu'avec un criblage de médicament sur un modèle de *C. elegans* SLA (Sclérose Latérale Amyotrophique), nous avons pu identifier une drogue, le pimozide, capable d'améliorer le phénotype de l'animal (Patten, Aggad et al. 2017). Par la suite, la drogue a été testée dans d'autres organismes tel que le poisson zébré, la souris ou encore dans un essai clinique de patient atteint de SLA. Il ne serait donc pas surprenant que l'utilisation de nos modèles puisse avoir un impact important pour découvrir de possibles molécules intéressantes dans plusieurs tauopathies telles qu'Alzheimer.

Références bibliographiques

Ahmed, T., A. Van der Jeugd, D. Blum, M. C. Galas, R. D'Hooge, L. Buee and D. Balschun (2014). "Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion." Neurobiol Aging **35**(11): 2474-2478.

Ajie, B. C., S. Estes, M. Lynch and P. C. Phillips (2005). "Behavioral degradation under mutation accumulation in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **170**(2): 655-660.

Alcedo, J. and C. Kenyon (2004). "Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons." Neuron **41**(1): 45-55.

Alexander, A. G., V. Marfil and C. Li (2014). "Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases." Front Genet **5**: 279.

Ando, K., K. I. Iijima, J. I. Elliott, Y. Kirino and T. Suzuki (2001). "Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid." J Biol Chem **276**(43): 40353-40361.

Andreadis, A. (2006). "Misregulation of tau alternative splicing in neurodegeneration and dementia." Prog Mol Subcell Biol **44**: 89-107.

Arai, T., D. Sasaki, T. Araya, T. Sato, Y. Sohma and M. Kanai (2014). "A cyclic KLVFF-derived peptide aggregation inhibitor induces the formation of less-toxic off-pathway amyloid-beta oligomers." Chembiochem **15**(17): 2577-2583.

Arendt, T., J. Stieler, A. M. Strijkstra, R. A. Hut, J. Rudiger, E. A. Van der Zee, T. Harkany, M. Holzer and W. Hartig (2003). "Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals." J Neurosci **23**(18): 6972-6981.

Aronov, S., G. Aranda, L. Behar and I. Ginzburg (2001). "Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal." J Neurosci **21**(17): 6577-6587.

Atri, A. (2019). "The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management." Med Clin North Am **103**(2): 263-293.

Bancher, C., H. Braak, P. Fischer and K. A. Jellinger (1993). "Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients." Neurosci Lett **162**(1-2): 179-182.

Barriere, A. and M. A. Felix (2014). "Isolation of *C. elegans* and related nematodes." WormBook: 1-19.

Baumgart, M., H. M. Snyder, M. C. Carrillo, S. Fazio, H. Kim and H. Johns (2015). "Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective." Alzheimers Dement **11**(6): 718-726.

Bekris, L. M., C. E. Yu, T. D. Bird and D. W. Tsuang (2010). "Genetics of Alzheimer disease." J Geriatr Psychiatry Neurol **23**(4): 213-227.

Berger, Z., H. Roder, A. Hanna, A. Carlson, V. Rangachari, M. Yue, Z. Wszolek, K. Ashe, J. Knight, D. Dickson, C. Andorfer, T. L. Rosenberry, J. Lewis, M. Hutton and C. Janus (2007). "Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy." J Neurosci **27**(14): 3650-3662.

Biernat, J. and E. M. Mandelkow (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**(3): 727-740.

Biernat, J., Y. Z. Wu, T. Timm, Q. Zheng-Fischhofer, E. Mandelkow, L. Meijer and E. M. Mandelkow (2002). "Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity." Mol Biol Cell **13**(11): 4013-4028.

Bitan, G., M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek and D. B. Teplow (2003). "Amyloid beta -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 330-335.

Bloom, G. S. (2014). "Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis." JAMA Neurol **71**(4): 505-508.

Bondi, M. W., E. C. Edmonds and D. P. Salmon (2017). "Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future." J Int Neuropsychol Soc **23**(9-10): 818-831.

Braak, E., H. Braak and E. M. Mandelkow (1994). "A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads." Acta Neuropathol **87**(6): 554-567.

Braak, H. and E. Braak (1988). "Neuropil threads occur in dendrites of tangle-bearing nerve cells." Neuropathol Appl Neurobiol **14**(1): 39-44.

Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.

Brandt, R., A. Gergou, I. Wacker, T. Fath and H. Hutter (2009). "A *Caenorhabditis elegans* model of tau hyperphosphorylation: induction of developmental defects by transgenic overexpression of Alzheimer's disease-like modified tau." Neurobiol Aging **30**(1): 22-33.

Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**(1): 71-94.

Brion, J. P., A. M. Couck, E. Passareiro and J. Flament-Durand (1985). "Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study." J Submicrosc Cytol **17**(1): 89-96.

Broe, M., C. E. Shepherd, E. A. Milward and G. M. Halliday (2001). "Relationship between DNA fragmentation, morphological changes and neuronal loss in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies." Acta Neuropathol **101**(6): 616-624.

Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte and P. R. Hof (2000). "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." Brain Res Brain Res Rev **33**(1): 95-130.

Bush, A. I. (2003). "The metallobiology of Alzheimer's disease." Trends Neurosci **26**(4): 207-214.

Butterfield, D. A., A. M. Swomley and R. Sultana (2013). "Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression." Antioxid Redox Signal **19**(8): 823-835.

Cabezas-Opazo, F. A., K. Vergara-Pulgar, M. J. Perez, C. Jara, C. Osorio-Fuentealba and R. A. Quintanilla (2015). "Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease." Oxid Med Cell Longev **2015**: 509654.

Caceres, A. and K. S. Kosik (1990). "Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons." Nature **343**(6257): 461-463.

Cai, H., Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D. R. Borchelt, D. L. Price and P. C. Wong (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." Nat Neurosci **4**(3): 233-234.

Calderon-Garciduenas, A. L. and C. Duyckaerts (2017). "Alzheimer disease." Handb Clin Neurol **145**: 325-337.

Cao, X. and T. C. Sudhof (2004). "Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation." J Biol Chem **279**(23): 24601-24611.

Cappai, R. (2014). "Making sense of the amyloid precursor protein: its tail tells an interesting tale." J Neurochem **130**(3): 325-327.

Cash, A. D., G. Aliev, S. L. Siedlak, A. Nunomura, H. Fujioka, X. Zhu, A. K. Raina, H. V. Vinters, M. Tabaton, A. B. Johnson, M. Paula-Barbosa, J. Avila, P. K. Jones, R. J. Castellani, M. A. Smith and G. Perry (2003). "Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation." Am J Pathol **162**(5): 1623-1627.

Castellani, R. J., A. Nunomura, H. G. Lee, G. Perry and M. A. Smith (2008). "Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above." J Alzheimers Dis **14**(4): 377-383.

Chen, J., Y. Kanai, N. J. Cowan and N. Hirokawa (1992). "Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons." Nature **360**(6405): 674-677.

Chen, P., E. J. Martinez-Finley, J. Bornhorst, S. Chakraborty and M. Aschner (2013). "Metal-induced neurodegeneration in *C. elegans*." Front Aging Neurosci **5**: 18.

Chen, S., B. Li, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (2008). "11PP2A affects tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A." J Biol Chem **283**(16): 10513-10521.

Chen, X., M. Li, S. Wang, H. Zhu, Y. Xiong and X. Liu (2014). "Pittsburgh compound B retention and progression of cognitive status--a meta-analysis." Eur J Neurol **21**(8): 1060-1067.

Chen, X., H. V. McCue, S. Q. Wong, S. S. Kashyap, B. C. Kraemer, J. W. Barclay, R. D. Burgoyne and A. Morgan (2015). "Erratum to: Ethosuximide ameliorates neurodegenerative disease phenotypes by modulating DAF-16/FOXO target gene expression." Mol Neurodegener **10**: 54.

Chen, X., H. V. McCue, S. Q. Wong, S. S. Kashyap, B. C. Kraemer, J. W. Barclay, R. D. Burgoyne and A. Morgan (2015). "Ethosuximide ameliorates neurodegenerative disease phenotypes by modulating DAF-16/FOXO target gene expression." Mol Neurodegener **10**: 51.

Cheng, Y. and F. Bai (2018). "The Association of Tau With Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease." Front Neurosci **12**: 163.

Chew, Y. L., X. Fan, J. Gotz and H. R. Nicholas (2013). "Aging in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*." Commun Integr Biol **6**(5): e25288.

Chew, Y. L., X. Fan, J. Gotz and H. R. Nicholas (2013). "PTL-1 regulates neuronal integrity and lifespan in *C. elegans*." J Cell Sci **126**(Pt 9): 2079-2091.

Chisholm, A. D. and J. Hardin (2005). "Epidermal morphogenesis." WormBook: 1-22.

Churcher, I. (2006). "Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease." Curr Top Med Chem **6**(6): 579-595.

Corsi, A. K., B. Wightman and M. Chalfie (2015). "A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*." WormBook: 1-31.

Cowan, C. M. and A. Mudher (2013). "Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies?" Front Neurol **4**: 114.

Cramer, P. E., J. R. Cirrito, D. W. Wesson, C. Y. Lee, J. C. Karlo, A. E. Zinn, B. T. Casali, J. L. Restivo, W. D. Goebel, M. J. James, K. R. Brunden, D. A. Wilson and G. E. Landreth (2012). "ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models." Science **335**(6075): 1503-1506.

Culetto, E. and D. B. Sattelle (2000). "A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes." Hum Mol Genet **9**(6): 869-877.

de la Monte, S. M. (2012). "Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **9**(1): 35-66.

Decker, J. M., L. Kruger, A. Sydow, S. Zhao, M. Frotscher, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (2015). "Pro-aggregant Tau impairs mossy fiber plasticity due to structural changes and Ca(++) dysregulation." Acta Neuropathol Commun **3**: 23.

Dehdashti, S. J., W. Zheng, J. R. Gever, R. Wilhelm, D. T. Nguyen, G. Sittampalam, J. C. McKew, C. P. Austin and S. B. Prusiner (2013). "A high-throughput screening assay for determining cellular levels of total tau protein." Curr Alzheimer Res **10**(7): 679-687.

Dent, J. A. (2001). "What can *Caenorhabditis elegans* tell us about nematocides and parasites?" Biotechnology and Bioprocess Engineering **6**(4): 252-263.

DeVos, S. L., D. K. Goncharoff, G. Chen, C. S. Kebodeaux, K. Yamada, F. R. Stewart, D. R. Schuler, S. E. Maloney, D. F. Wozniak, F. Rigo, C. F. Bennett, J. R. Cirrito, D. M. Holtzman and T. M. Miller (2013). "Antisense reduction of tau in adult mice protects against seizures." J Neurosci **33**(31): 12887-12897.

Dickson, D. W. (1999). "Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration." J Neurol **246 Suppl 2**: I16-15.

Dixit, R., J. L. Ross, Y. E. Goldman and E. L. Holzbaur (2008). "Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau." Science **319**(5866): 1086-1089.

Dodart, J. C., K. R. Bales, K. S. Gannon, S. J. Greene, R. B. DeMattos, C. Mathis, C. A. DeLong, S. Wu, X. Wu, D. M. Holtzman and S. M. Paul (2002). "Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model." Nat Neurosci **5**(5): 452-457.

Dubois, B., H. Hampel, H. H. Feldman, P. Scheltens, P. Aisen, S. Andrieu, H. Bakardjian, H. Benali, L. Bertram, K. Blennow, K. Broich, E. Cavedo, S. Crutch, J. F. Dartigues, C. Duyckaerts, S. Epelbaum, G. B. Frisoni, S. Gauthier, R. Genthon, A. A. Gouw, M. O. Habert, D. M. Holtzman, M. Kivipelto, S. Lista, J. L. Molinuevo, S. E. O'Bryant, G. D. Rabinovici, C. Rowe, S. Salloway, L. S. Schneider, R. Sperling, M. Teichmann, M. C. Carrillo, J. Cummings, C. R. Jack, Jr., G. Proceedings of the Meeting of the International Working, A. D. the American Alzheimer's Association on "The Preclinical State of, July and U. S. A. Washington Dc (2016). "Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria." Alzheimers Dement **12**(3): 292-323.

Duerr, J. S. (2006). "Immunohistochemistry." WormBook: 1-61.

Ebneth, A., R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek and E. Mandelkow (1998). "Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease." J Cell Biol **143**(3): 777-794.

Elder, G. A., V. L. Friedrich, Jr., P. Bosco, C. Kang, A. Gourov, P. H. Tu, V. M. Lee and R. A. Lazzarini (1998). "Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content." J Cell Biol **141**(3): 727-739.

Epis, R., E. Marcello, F. Gardoni and M. Di Luca (2012). "Alpha, beta-and gamma-secretases in Alzheimer's disease." Front Biosci (Schol Ed) **4**: 1126-1150.

Estes, S., P. C. Phillips, D. R. Denver, W. K. Thomas and M. Lynch (2004). "Mutation accumulation in populations of varying size: the distribution of mutational effects for fitness correlates in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **166**(3): 1269-1279.

Fatouros, C., G. J. Pir, J. Biernat, S. P. Koushika, E. Mandelkow, E. M. Mandelkow, E. Schmidt and R. Baumeister (2012). "Inhibition of tau aggregation in a novel *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy mitigates proteotoxicity." Hum Mol Genet **21**(16): 3587-3603.

Fay, D. (2006). "Genetic mapping and manipulation: chapter 1--Introduction and basics." WormBook: 1-12.

Feinstein, S. C. and L. Wilson (2005). "Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 268-279.

Fernandez-Nogales, M., J. R. Cabrera, M. Santos-Galindo, J. J. Hoozemans, I. Ferrer, A. J. Rozemuller, F. Hernandez, J. Avila and J. J. Lucas (2014). "Huntington's disease is a four-repeat tauopathy with tau nuclear rods." Nat Med **20**(8): 881-885.

Foster, N. L., T. N. Chase, P. Fedio, N. J. Patronas, R. A. Brooks and G. Di Chiro (1983). "Alzheimer's disease: focal cortical changes shown by positron emission tomography." Neurology **33**(8): 961-965.

Frakes, A. E., M. G. Metcalf, S. U. Tronnes, R. Bar-Ziv, J. Durieux, H. K. Gildea, N. Kandahari, S. Monshietehadi and A. Dillin (2020). "Four glial cells regulate ER stress resistance and longevity via neuropeptide signaling in *C. elegans*." Science **367**(6476): 436-440.

Frandemiche, M. L., S. De Seranno, T. Rush, E. Borel, A. Elie, I. Arnal, F. Lante and A. Buisson (2014). "Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers." J Neurosci **34**(17): 6084-6097.

Frappier, T. F., I. S. Georgieff, K. Brown and M. L. Shelanski (1994). "tau Regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling." J Neurochem **63**(6): 2288-2294.

Fuster-Matanzo, A., E. G. de Barreda, H. N. Dawson, M. P. Vitek, J. Avila and F. Hernandez (2009). "Function of tau protein in adult newborn neurons." FEBS Lett **583**(18): 3063-3068.

Gao, Y. and S. W. Pimplikar (2001). "The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14979-14984.

Gendron, T. F. and L. Petrucelli (2009). "The role of tau in neurodegeneration." Mol Neurodegener **4**: 13.

Gilley, J., A. Seereeram, K. Ando, S. Mosely, S. Andrews, M. Kerschensteiner, T. Misgeld, J. P. Brion, B. Anderton, D. P. Hanger and M. P. Coleman (2012). "Age-dependent axonal transport and locomotor changes and tau hypophosphorylation in a "P301L" tau knockin mouse." Neurobiol Aging **33**(3): 621 e621-621 e615.

Goedert, M. and R. Jakes (1990). "Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization." EMBO J **9**(13): 4225-4230.

Goldman, J. S., S. E. Hahn, J. W. Catania, S. LaRusse-Eckert, M. B. Butson, M. Rumbaugh, M. N. Strecker, J. S. Roberts, W. Burke, R. Mayeux, T. Bird, G. American College of Medical and C. the National Society of Genetic (2011). "Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors." Genet Med **13**(6): 597-605.

Gomez-Isla, T., R. Hollister, H. West, S. Mui, J. H. Growdon, R. C. Petersen, J. E. Parisi and B. T. Hyman (1997). "Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Ann Neurol **41**(1): 17-24.

Gomez-Ramos, A., J. Diaz-Nido, M. A. Smith, G. Perry and J. Avila (2003). "Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells." J Neurosci Res **71**(6): 863-870.

Goncalves, R. A., N. Wijesekara, P. E. Fraser and F. G. De Felice (2019). "The Link Between Tau and Insulin Signaling: Implications for Alzheimer's Disease and Other Tauopathies." Front Cell Neurosci **13**: 17.

Gong, C. X., T. J. Singh, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (1993). "Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain." J Neurochem **61**(3): 921-927.

Gotz, J., F. Chen, J. van Dorpe and R. M. Nitsch (2001). "Formation of neurofibrillary tangles in P301 τ transgenic mice induced by A β 42 fibrils." Science **293**(5534): 1491-1495.

Gotz, J., G. Halliday and R. M. Nisbet (2019). "Molecular Pathogenesis of the Tauopathies." Annu Rev Pathol **14**: 239-261.

Gratuze, M. and E. Planel (2017). "Regulation of brain insulin signaling: A new function for tau." J Exp Med **214**(8): 2171-2173.

Gray, J. M., J. J. Hill and C. I. Bargmann (2005). "A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3184-3191.

Grober, E., D. Dickson, M. J. Sliwinski, H. Buschke, M. Katz, H. Crystal and R. B. Lipton (1999). "Memory and mental status correlates of modified Braak staging." Neurobiol Aging **20**(6): 573-579.

Gunawardena, S. and L. S. Goldstein (2001). "Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*." Neuron **32**(3): 389-401.

Haberman, R. P., A. Branch and M. Gallagher (2017). "Targeting Neural Hyperactivity as a Treatment to Stem Progression of Late-Onset Alzheimer's Disease." Neurotherapeutics **14**(3): 662-676.

Halaschek-Wiener, J., J. S. Khattra, S. McKay, A. Pouzyrev, J. M. Stott, G. S. Yang, R. A. Holt, S. J. Jones, M. A. Marra, A. R. Brooks-Wilson and D. L. Riddle (2005). "Analysis of long-lived *C. elegans* daf-2 mutants using serial analysis of gene expression." Genome Res **15**(5): 603-615.

Hamelin, M., I. M. Scott, J. C. Way and J. G. Culotti (1992). "The mec-7 beta-tubulin gene of *Caenorhabditis elegans* is expressed primarily in the touch receptor neurons." EMBO J **11**(8): 2885-2893.

Hanger, D. P., B. H. Anderton and W. Noble (2009). "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease." Trends Mol Med **15**(3): 112-119.

Harada, A., K. Oguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda and N. Hirokawa (1994). "Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein." Nature **369**(6480): 488-491.

Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.

Hasegawa, M., M. J. Smith and M. Goedert (1998). "Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly." FEBS Lett **437**(3): 207-210.

Hass, M. R. and B. A. Yankner (2005). "A γ -secretase-independent mechanism of signal transduction by the amyloid precursor protein." J Biol Chem **280**(44): 36895-36904.

Hayden, E. Y. and D. B. Teplow (2013). "Amyloid beta-protein oligomers and Alzheimer's disease." Alzheimers Res Ther **5**(6): 60.

He, Z., J. L. Guo, J. D. McBride, S. Narasimhan, H. Kim, L. Changolkar, B. Zhang, R. J. Gathagan, C. Yue, C. Dengler, A. Stieber, M. Nitla, D. A. Coulter, T. Abel, K. R. Brunden, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2018). "Amyloid-beta plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation." Nat Med **24**(1): 29-38.

Hedskog, L., S. Zhang and M. Ankarcrona (2012). "Strategic role for mitochondria in Alzheimer's disease and cancer." Antioxid Redox Signal **16**(12): 1476-1491.

Hock, B. J., Jr. and B. T. Lamb (2001). "Transgenic mouse models of Alzheimer's disease." Trends Genet **17**(10): S7-12.

Holmes, C., D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R. W. Jones, R. Bullock, S. Love, J. W. Neal, E. Zotova and J. A. Nicoll (2008). "Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial." Lancet **372**(9634): 216-223.

Holtzman, D. M., J. Herz and G. Bu (2012). "Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(3): a006312.

Hong, X. P., C. X. Peng, W. Wei, Q. Tian, Y. H. Liu, X. Q. Yao, Y. Zhang, F. Y. Cao, Q. Wang and J. Z. Wang (2010). "Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis." Hippocampus **20**(12): 1339-1349.

Hughes, S. E., K. Evason, C. Xiong and K. Kornfeld (2007). "Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes." PLoS Genet **3**(2): e25.

Hung, A. Y., E. H. Koo, C. Haass and D. J. Selkoe (1992). "Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9439-9443.

Hung, A. Y. and D. J. Selkoe (1994). "Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein." EMBO J **13**(3): 534-542.

Hunt, P. R. (2017). "The *C. elegans* model in toxicity testing." J Appl Toxicol **37**(1): 50-59.

Hutton, M., C. L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R. C. Petersen, M. Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J. M. Kwon, P. Nowotny, L. K. Che, J. Norton, J. C. Morris, L. A. Reed, J. Trojanowski, H. Basun, L. Lannfelt, M. Neystat, S. Fahn, F. Dark, T. Tannenberg, P. R. Dodd, N. Hayward, J. B. Kwok, P. R. Schofield, A. Andreadis, J. Snowden, D. Craufurd, D. Neary, F. Owen, B. A. Oostra, J. Hardy, A. Goate, J. van Swieten, D. Mann, T. Lynch and P. Heutink (1998). "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17." Nature **393**(6686): 702-705.

Ittner, L. M., Y. D. Ke, F. Delerue, M. Bi, A. Gladbach, J. van Eersel, H. Wolfing, B. C. Chieng, M. J. Christie, I. A. Napier, A. Eckert, M. Staufienbiel, E. Hardeman and J. Gotz (2010). "Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models." Cell **142**(3): 387-397.

Iwasaki, K., J. Staunton, O. Saifee, M. Nonet and J. H. Thomas (1997). "aex-3 encodes a novel regulator of presynaptic activity in *C. elegans*." Neuron **18**(4): 613-622.

Janus, C., J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, P. Horne, D. Heslin, J. French, H. T. Mount, R. A. Nixon, M. Mercken, C. Bergeron, P. E. Fraser, P. St George-Hyslop and D. Westaway (2000). "A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease." Nature **408**(6815): 979-982.

Jia, K., D. Chen and D. L. Riddle (2004). "The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span." Development **131**(16): 3897-3906.

Johnson, T. E. and W. B. Wood (1982). "Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(21): 6603-6607.

Jorgensen, E. M. (2005). "Gaba." WormBook: 1-13.

Jouanne, M., S. Rault and A. S. Voisin-Chiret (2017). "Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents." Eur J Med Chem **139**: 153-167.

Kadavath, H., R. V. Hofele, J. Biernat, S. Kumar, K. Tepper, H. Urlaub, E. Mandelkow and M. Zweckstetter (2015). "Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(24): 7501-7506.

Kaletta, T. and M. O. Hengartner (2006). "Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism." Nat Rev Drug Discov **5**(5): 387-398.

Kamal, A., G. B. Stokin, Z. Yang, C. H. Xia and L. S. Goldstein (2000). "Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I." Neuron **28**(2): 449-459.

Kanaan, N. M., G. A. Morfini, N. E. LaPointe, G. F. Pigino, K. R. Patterson, Y. Song, A. Andreadis, Y. Fu, S. T. Brady and L. I. Binder (2011). "Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases." J Neurosci **31**(27): 9858-9868.

Kanemaru, K., K. Takio, R. Miura, K. Titani and Y. Ihara (1992). "Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments." J Neurochem **58**(5): 1667-1675.

Kara, E., H. Ling, A. M. Pittman, K. Shaw, R. de Silva, R. Simone, J. L. Holton, J. D. Warren, J. D. Rohrer, G. Xiromerisiou, A. Lees, J. Hardy, H. Houlden and T. Revesz (2012). "The MAPT p.A152T variant is a risk factor associated with tauopathies with atypical clinical and neuropathological features." Neurobiol Aging **33**(9): 2231 e2237-2231 e2214.

Kawahara, M. and Y. Kuroda (2000). "Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis." Brain Res Bull **53**(4): 389-397.

Kimberly, W. T., J. B. Zheng, S. Y. Guenette and D. J. Selkoe (2001). "The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner." J Biol Chem **276**(43): 40288-40292.

Kimberly, W. T., J. B. Zheng, T. Town, R. A. Flavell and D. J. Selkoe (2005). "Physiological regulation of the beta-amyloid precursor protein signaling domain by c-Jun N-terminal kinase JNK3 during neuronal differentiation." J Neurosci **25**(23): 5533-5543.

Kimble, J. and D. Hirsh (1979). "The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **70**(2): 396-417.

Kimura, T., D. J. Whitcomb, J. Jo, P. Regan, T. Piers, S. Heo, C. Brown, T. Hashikawa, M. Murayama, H. Seok, I. Sotiropoulos, E. Kim, G. L. Collingridge, A. Takashima and K. Cho (2014). "Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1633): 20130144.

King, M. E., H. M. Kan, P. W. Baas, A. Erisir, C. G. Glabe and G. S. Bloom (2006). "Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid." J Cell Biol **175**(4): 541-546.

Kitazawa, M., R. Medeiros and F. M. Laferla (2012). "Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions." Curr Pharm Des **18**(8): 1131-1147.

Klunk, W., C. Mathis, J. Price, S. DeKosky, B. Lopresti, N. Tsopelas, J. Saxton and R. Nebes (2009). Amyloid Imaging with PET in Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Clinically Unimpaired Subjects: 1-29.

Knops, J., K. S. Kosik, G. Lee, J. D. Pardee, L. Cohen-Gould and L. McConlogue (1991). "Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes." J Cell Biol **114**(4): 725-733.

Konzack, S., E. Thies, A. Marx, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (2007). "Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons." J Neurosci **27**(37): 9916-9927.

Kopke, E., Y. C. Tung, S. Shaikh, A. C. Alonso, K. Iqbal and I. Grundke-Iqbal (1993). "Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease." J Biol Chem **268**(32): 24374-24384.

Kovacs, G. G., A. Wohrer, T. Strobel, G. Botond, J. Attems and H. Budka (2011). "Unclassifiable tauopathy associated with an A152T variation in MAPT exon 7." Clin Neuropathol **30**(1): 3-10.

Kraemer, B. C., B. Zhang, J. B. Leverenz, J. H. Thomas, J. Q. Trojanowski and G. D. Schellenberg (2003). "Neurodegeneration and defective neurotransmission in a Caenorhabditis elegans model of tauopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9980-9985.

Kril, J. J., S. Patel, A. J. Harding and G. M. Halliday (2002). "Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation." Acta Neuropathol **103**(4): 370-376.

Kuhn, P. H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J. W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner and S. F. Lichtenthaler (2010). "ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons." EMBO J **29**(17): 3020-3032.

LaFerla, F. M. and K. N. Green (2012). "Animal models of Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(11).

Lau, D. H., M. Hogseth, E. C. Phillips, M. J. O'Neill, A. M. Pooler, W. Noble and D. P. Hanger (2016). "Critical residues involved in tau binding to fyn: implications for tau phosphorylation in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol Commun **4**(1): 49.

Lazarov, O., M. Lee, D. A. Peterson and S. S. Sisodia (2002). "Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice." J Neurosci **22**(22): 9785-9793.

Lee, C. and S. Ham (2011). "Characterizing amyloid-beta protein misfolding from molecular dynamics simulations with explicit water." J Comput Chem **32**(2): 349-355.

Lee, G., N. Cowan and M. Kirschner (1988). "The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain." Science **239**(4837): 285-288.

Lee, G., S. T. Newman, D. L. Gard, H. Band and G. Panchamoorthy (1998). "Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases." J Cell Sci **111 (Pt 21)**: 3167-3177.

Lee, H. G., G. Perry, P. I. Moreira, M. R. Garrett, Q. Liu, X. Zhu, A. Takeda, A. Nunomura and M. A. Smith (2005). "Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector?" Trends Mol Med **11**(4): 164-169.

Lee, M. S., S. C. Kao, C. A. Lemere, W. Xia, H. C. Tseng, Y. Zhou, R. Neve, M. K. Ahljianian and L. H. Tsai (2003). "APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation." J Cell Biol **163**(1): 83-95.

Lehrbach, N. J., F. Ji and R. Sadreyev (2017). "Next-Generation Sequencing for Identification of EMS-Induced Mutations in *Caenorhabditis elegans*." Curr Protoc Mol Biol **117**: 7 29 21-27 29 12.

Lei, P., S. Ayton, D. I. Finkelstein, L. Spoorri, G. D. Ciccotosto, D. K. Wright, B. X. Wong, P. A. Adlard, R. A. Cherny, L. Q. Lam, B. R. Roberts, I. Volitakis, G. F. Egan, C. A. McLean, R. Cappai, J. A. Duce and A. I. Bush (2012). "Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export." Nat Med **18**(2): 291-295.

Li, J., K. X. Huang and W. D. Le (2013). "Establishing a novel *C. elegans* model to investigate the role of autophagy in amyotrophic lateral sclerosis." Acta Pharmacol Sin **34**(5): 644-650.

Li, J. and W. Le (2013). "Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*." Exp Neurol **250**: 94-103.

Li, X., Y. Kumar, H. Zempel, E. M. Mandelkow, J. Biernat and E. Mandelkow (2011). "Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration." EMBO J **30**(23): 4825-4837.

Li, X. C., Y. Hu, Z. H. Wang, Y. Luo, Y. Zhang, X. P. Liu, Q. Feng, Q. Wang, K. Ye, G. P. Liu and J. Z. Wang (2016). "Human wild-type full-length tau accumulation disrupts mitochondrial dynamics and the functions via increasing mitofusins." Sci Rep **6**: 24756.

Lichtenthaler, S. F. (2011). "alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential." J Neurochem **116**(1): 10-21.

Loomis, P. A., T. H. Howard, R. P. Castleberry and L. I. Binder (1990). "Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8422-8426.

Lopes, G. K., H. M. Schulman and M. Hermes-Lima (1999). "Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions." Biochim Biophys Acta **1472**(1-2): 142-152.

Lott, I. T. and M. Dierssen (2010). "Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome." Lancet Neurol **9**(6): 623-633.

Lovestone, S. and C. H. Reynolds (1997). "The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes." Neuroscience **78**(2): 309-324.

Lu, D. C., S. Soriano, D. E. Bredesen and E. H. Koo (2003). "Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity." J Neurochem **87**(3): 733-741.

Ma, L., Y. Zhao, Y. Chen, B. Cheng, A. Peng and K. Huang (2018). "Caenorhabditis elegans as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases." Eur J Pharmacol **819**: 169-180.

Mack, H. I. D., P. Zhang, B. R. Fonslow and J. R. Yates (2017). "The protein kinase MBK-1 contributes to lifespan extension in daf-2 mutant and germline-deficient Caenorhabditis elegans." Aging (Albany NY) **9**(5): 1414-1432.

Magnani, E., J. Fan, L. Gasparini, M. Golding, M. Williams, G. Schiavo, M. Goedert, L. A. Amos and M. G. Spillantini (2007). "Interaction of tau protein with the dynactin complex." EMBO J **26**(21): 4546-4554.

Mandelkow, E. M., J. Biernat, G. Drewes, N. Gustke, B. Trinczek and E. Mandelkow (1995). "Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules." Neurobiol Aging **16**(3): 355-362; discussion 362-353.

Mandelkow, E. M. and E. Mandelkow (1998). "Tau in Alzheimer's disease." Trends Cell Biol **8**(11): 425-427.

Mandelkow, E. M. and E. Mandelkow (2012). "Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(7): a006247.

Marciniak, E., A. Leboucher, E. Caron, T. Ahmed, A. Tailleur, J. Dumont, T. Issad, E. Gerhardt, P. Pagesy, M. Vileno, C. Bournonville, M. Hamdane, K. Bantubungi, S. Lancel, D. Demeyer, S. Eddarkaoui, E. Vallez, D. Vieau, S. Humez, E. Faivre, B. Grenier-Boley, T. F. Outeiro, B. Staels, P.

Amouyel, D. Balschun, L. Buee and D. Blum (2017). "Tau deletion promotes brain insulin resistance." J Exp Med **214**(8): 2257-2269.

Mariol, M. C., L. Walter, S. Bellemin and K. Gieseler (2013). "A rapid protocol for integrating extrachromosomal arrays with high transmission rate into the C. elegans genome." J Vis Exp(82): e50773.

Marquie, M., M. Siao Tick Chong, A. Anton-Fernandez, E. E. Verwer, N. Saez-Calveras, A. C. Meltzer, P. Ramanan, A. C. Amaral, J. Gonzalez, M. D. Normandin, M. P. Frosch and T. Gomez-Isla (2017). "[F-18]-AV-1451 binding correlates with postmortem neurofibrillary tangle Braak staging." Acta Neuropathol **134**(4): 619-628.

Martin, L., X. Latypova and F. Terro (2011). "Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease." Neurochem Int **58**(4): 458-471.

Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-639.

McCormick, A. V., J. M. Wheeler, C. R. Guthrie, N. F. Liachko and B. C. Kraemer (2013). "Dopamine D2 receptor antagonism suppresses tau aggregation and neurotoxicity." Biol Psychiatry **73**(5): 464-471.

McDermott, J. B., S. Aamodt and E. Aamodt (1996). "ptl-1, a Caenorhabditis elegans gene whose products are homologous to the tau microtubule-associated proteins." Biochemistry **35**(29): 9415-9423.

Mehta, D., R. Jackson, G. Paul, J. Shi and M. Sabbagh (2017). "Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015." Expert Opin Investig Drugs **26**(6): 735-739.

Menting, K. W. and J. A. Claassen (2014). "beta-secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease." Front Aging Neurosci **6**: 165.

Mietelska-Porowska, A., U. Wasik, M. Goras, A. Filipek and G. Niewiadomska (2014). "Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction." Int J Mol Sci **15**(3): 4671-4713.

Miyasaka, T., Z. Ding, K. Gengyo-Ando, M. Oue, H. Yamaguchi, S. Mitani and Y. Ihara (2005). "Progressive neurodegeneration in C. elegans model of tauopathy." Neurobiol Dis **20**(2): 372-383.

Miyasaka, T., C. Xie, S. Yoshimura, Y. Shinzaki, S. Yoshina, E. Kage-Nakadai, S. Mitani and Y. Ihara (2016). "Curcumin improves tau-induced neuronal dysfunction of nematodes." Neurobiol Aging **39**: 69-81.

Moerman, D. G. and A. Fire (1997). Muscle: Structure, Function, and Development. C. elegans II. ed, D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess. Cold Spring Harbor (NY).

Mondragon-Rodriguez, S., E. Trillaud-Doppia, A. Dudilot, C. Bourgeois, M. Lauzon, N. Leclerc and J. Boehm (2012). "Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation." J Biol Chem **287**(38): 32040-32053.

Morishima-Kawashima, M., M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, K. Titani and Y. Ihara (1995). "Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau." J Biol Chem **270**(2): 823-829.

Morita, T. and K. Sobue (2009). "Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway." J Biol Chem **284**(40): 27734-27745.

Morley, J. F. and R. I. Morimoto (2004). "Regulation of longevity in Caenorhabditis elegans by heat shock factor and molecular chaperones." Mol Biol Cell **15**(2): 657-664.

Morris, J. K. and J. M. Burns (2012). "Insulin: an emerging treatment for Alzheimer's disease dementia?" Curr Neurol Neurosci Rep **12**(5): 520-527.

Morris, M., S. Maeda, K. Vossel and L. Mucke (2011). "The many faces of tau." Neuron **70**(3): 410-426.

Morsch, R., W. Simon and P. D. Coleman (1999). "Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles." J Neuropathol Exp Neurol **58**(2): 188-197.

Moya, K. L., L. I. Benowitz, G. E. Schneider and B. Allinquant (1994). "The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis." Dev Biol **161**(2): 597-603.

Muller, R., M. Heinrich, S. Heck, D. Blohm and C. Richter-Landsberg (1997). "Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes." Cell Tissue Res **288**(2): 239-249.

Mulvihill, P. and G. Perry (1989). "Immunoaffinity demonstration that paired helical filaments of Alzheimer disease share epitopes with neurofilaments, MAP2 and tau." Brain Res **484**(1-2): 150-156.

Muresan, Z. and V. Muresan (2005). "Coordinated transport of phosphorylated amyloid-beta precursor protein and c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-1." J Cell Biol **171**(4): 615-625.

Murphy, C. T. and P. J. Hu (2013). "Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*." WormBook: 1-43.

Naseri, N. N., H. Wang, J. Guo, M. Sharma and W. Luo (2019). "The complexity of tau in Alzheimer's disease." Neurosci Lett **705**: 183-194.

Nelson, P. T., E. Head, F. A. Schmitt, P. R. Davis, J. H. Neltner, G. A. Jicha, E. L. Abner, C. D. Smith, L. J. Van Eldik, R. J. Kryscio and S. W. Scheff (2011). "Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies." Acta Neuropathol **121**(5): 571-587.

Nhan, H. S., K. Chiang and E. H. Koo (2015). "The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes." Acta Neuropathol **129**(1): 1-19.

Ni, R., A. Marutle and A. Nordberg (2013). "Modulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid-beta interactions in Alzheimer's disease brain." J Alzheimers Dis **33**(3): 841-851.

Nigon, V. M. and M. A. Felix (2017). "History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms." WormBook **2017**: 1-84.

Nonet, M. L., O. Saifee, H. Zhao, J. B. Rand and L. Wei (1998). "Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants." J Neurosci **18**(1): 70-80.

Nonet, M. L., J. E. Staunton, M. P. Kilgard, T. Fergestad, E. Hartwieg, H. R. Horvitz, E. M. Jorgensen and B. J. Meyer (1997). "*Caenorhabditis elegans* rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles." J Neurosci **17**(21): 8061-8073.

Nunomura, A., G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C. S. Atwood, R. B. Petersen and M. A. Smith (2001). "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **60**(8): 759-767.

Oh, S. W., A. Mukhopadhyay, N. Svrikapa, F. Jiang, R. J. Davis and H. A. Tissenbaum (2005). "JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(12): 4494-4499.

Ono, K., K. Hasegawa, H. Naiki and M. Yamada (2004). "Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro." Biochim Biophys Acta **1690**(3): 193-202.

Orgogozo, J. M., S. Gilman, J. F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B. F. Michel, M. Boada, A. Frank and C. Hock (2003). "Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization." Neurology **61**(1): 46-54.

Oster-Granite, M. L., D. L. McPhie, J. Greenan and R. L. Neve (1996). "Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein." J Neurosci **16**(21): 6732-6741.

Papasozomenos, S. C. and L. I. Binder (1987). "Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system." Cell Motil Cytoskeleton **8**(3): 210-226.

Pardossi-Piquard, R., A. Petit, T. Kawarai, C. Sunyach, C. Alves da Costa, B. Vincent, S. Ring, L. D'Adamio, J. Shen, U. Muller, P. St George Hyslop and F. Checler (2005). "Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP." Neuron **46**(4): 541-554.

Parida, L., S. Neogi and V. Padmanabhan (2014). "Effect of temperature pre-exposure on the locomotion and chemotaxis of *C. elegans*." PLoS One **9**(10): e111342.

Patten, S. A., D. Aggad, J. Martinez, E. Tremblay, J. Petrillo, G. A. Armstrong, A. La Fontaine, C. Maios, M. Liao, S. Ciura, X. Y. Wen, V. Rafuse, J. Ichida, L. Zinman, J. P. Julien, E. Kabashi, R. Robitaille, L. Korngut, J. A. Parker and P. Drapeau (2017). "Neuroleptics as therapeutic compounds stabilizing neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis." JCI Insight **2**(22).

Pei, J. J., W. L. An, X. W. Zhou, T. Nishimura, J. Norberg, E. Benedikz, J. Gotz and B. Winblad (2006). "P70 S6 kinase mediates tau phosphorylation and synthesis." FEBS Lett **580**(1): 107-114.

Perez, M., R. Cuadros, M. A. Smith, G. Perry and J. Avila (2000). "Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal." FEBS Lett **486**(3): 270-274.

Peters, F., H. Salihoglu, K. Pratsch, E. Herzog, M. Pignoni, C. Sgobio, S. F. Lichtenthaler, U. Neumann and J. Herms (2019). "Tau deletion reduces plaque-associated BACE1 accumulation and decelerates plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease." EMBO J **38**(23): e102345.

Pietrzik, C. U., I. S. Yoon, S. Jaeger, T. Busse, S. Weggen and E. H. Koo (2004). "FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein." J Neurosci **24**(17): 4259-4265.

Pir, G. J., B. Choudhary and E. Mandelkow (2017). "Caenorhabditis elegans models of tauopathy." FASEB J **31**(12): 5137-5148.

Pir, G. J., B. Choudhary, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (2016). "Tau mutant A152T, a risk factor for FTD/PSP, induces neuronal dysfunction and reduced lifespan independently of aggregation in a C. elegans Tauopathy model." Mol Neurodegener **11**: 33.

Planel, E., T. Miyasaka, T. Launey, D. H. Chui, K. Tanemura, S. Sato, O. Murayama, K. Ishiguro, Y. Tatebayashi and A. Takashima (2004). "Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease." J Neurosci **24**(10): 2401-2411.

Planel, E., K. E. Richter, C. E. Nolan, J. E. Finley, L. Liu, Y. Wen, P. Krishnamurthy, M. Herman, L. Wang, J. B. Schachter, R. B. Nelson, L. F. Lau and K. E. Duff (2007). "Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia." J Neurosci **27**(12): 3090-3097.

Plouffe, V., N. V. Mohamed, J. Rivest-McGraw, J. Bertrand, M. Lauzon and N. Leclerc (2012). "Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion." PLoS One **7**(5): e36873.

Pooler, A. M., E. C. Phillips, D. H. Lau, W. Noble and D. P. Hanger (2013). "Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity." EMBO Rep **14**(4): 389-394.

Pooler, A. M., A. Usardi, C. J. Evans, K. L. Philpott, W. Noble and D. P. Hanger (2012). "Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation." Neurobiol Aging **33**(2): 431 e427-438.

Poorkaj, P., T. D. Bird, E. Wijsman, E. Nemens, R. M. Garruto, L. Anderson, A. Andreadis, W. C. Wiederholt, M. Raskind and G. D. Schellenberg (1998). "Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia." Ann Neurol **43**(6): 815-825.

Probst, A., J. Gotz, K. H. Wiederhold, M. Tolnay, C. Mistl, A. L. Jaton, M. Hong, T. Ishihara, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, R. A. Crowther, M. G. Spillantini, K. Burki and M. Goedert (2000). "Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein." Acta Neuropathol **99**(5): 469-481.

Raizen, D. M., J. E. Zimmerman, M. H. Maycock, U. D. Ta, Y. J. You, M. V. Sundaram and A. I. Pack (2008). "Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state." Nature **451**(7178): 569-572.

Rajasekhar, K., M. Chakrabarti and T. Govindaraju (2015). "Function and toxicity of amyloid beta and recent therapeutic interventions targeting amyloid beta in Alzheimer's disease." Chem Commun (Camb) **51**(70): 13434-13450.

Rajasekhar, K., S. N. Suresh, R. Manjithaya and T. Govindaraju (2015). "Rationally designed peptidomimetic modulators of abeta toxicity in Alzheimer's disease." Sci Rep **5**: 8139.

Rand, J. B. (2007). "Acetylcholine." WormBook: 1-21.

Rao, M. V., M. K. Houseweart, T. L. Williamson, T. O. Crawford, J. Folmer and D. W. Cleveland (1998). "Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation." J Cell Biol **143**(1): 171-181.

Roberson, E. D., K. Scarce-Levie, J. J. Palop, F. Yan, I. H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G. Q. Yu and L. Mucke (2007). "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model." Science **316**(5825): 750-754.

Rodriguez, G., P. Vitali, P. Calvini, C. Bordoni, N. Girtler, G. Taddei, G. Mariani and F. Nobili (2000). "Hippocampal perfusion in mild Alzheimer's disease." Psychiatry Res **100**(2): 65-74.

Rodriguez-Martin, T., I. Cuchillo-Ibanez, W. Noble, F. Nyenya, B. H. Anderton and D. P. Hanger (2013). "Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation." Neurobiol Aging **34**(9): 2146-2157.

Rodriguez-Martin, T., A. M. Pooler, D. H. W. Lau, G. M. Morotz, K. J. De Vos, J. Gilley, M. P. Coleman and D. P. Hanger (2016). "Reduced number of axonal mitochondria and tau hypophosphorylation in mouse P301L tau knockin neurons." Neurobiol Dis **85**: 1-10.

Rodriguez-Rodriguez, P., A. Sandebring-Matton, P. Merino-Serrais, C. Parrado-Fernandez, A. Rabano, B. Winblad, J. Avila, I. Ferrer and A. Cedazo-Minguez (2017). "Tau hyperphosphorylation induces oligomeric insulin accumulation and insulin resistance in neurons." Brain **140**(12): 3269-3285.

Sabo, S. L., A. F. Ikin, J. A. n. e.-c. w. t. t. d. o. t. A. a. p. p. d. h. w. N. p. Buxbaum and P. Greengard (2003). "The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo." J Neurosci **23**(13): 5407-5415.

Sabo, S. L., A. F. Ikin, J. D. Buxbaum and P. Greengard (2001). "The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement." J Cell Biol **153**(7): 1403-1414.

Sambamurti, K., N. H. Greig and D. K. Lahiri (2002). "Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease." Neuromolecular Med **1**(1): 1-31.

Santacruz, K., J. Lewis, T. Spires, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, A. Guimaraes, M. DeTure, M. Ramsden, E. McGowan, C. Forster, M. Yue, J. Orne, C. Janus, A. Mariash, M. Kuskowski, B. Hyman, M. Hutton and K. H. Ashe (2005). "Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function." Science **309**(5733): 476-481.

Saul, N., K. Pietsch, R. Menzel, S. R. Sturzenbaum and C. E. Steinberg (2010). "The longevity effect of tannic acid in *Caenorhabditis elegans*: Disposable Soma meets hormesis." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **65**(6): 626-635.

Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandevent, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games and P. Seubert (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." Nature **400**(6740): 173-177.

Schindler, A. J., L. R. Baugh and D. R. Sherwood (2014). "Identification of late larval stage developmental checkpoints in *Caenorhabditis elegans* regulated by insulin/IGF and steroid hormone signaling pathways." *PLoS Genet* **10**(6): e1004426.

Scholl, M., S. N. Lockhart, D. R. Schonhaut, J. P. O'Neil, M. Janabi, R. Ossenkoppele, S. L. Baker, J. W. Vogel, J. Faria, H. D. Schwimmer, G. D. Rabinovici and W. J. Jagust (2016). "PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain." *Neuron* **89**(5): 971-982.

Selkoe, D. and R. Kopan (2003). "Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration." *Annu Rev Neurosci* **26**: 565-597.

Selkoe, D. J. (1993). "Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease." *Trends Neurosci* **16**(10): 403-409.

Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* **81**(2): 741-766.

Serrano-Pozo, A., C. M. Williams, I. Ferrer, E. Uro-Coste, M. B. Delisle, C. A. Maurage, C. Hock, R. M. Nitsch, E. Masliah, J. H. Growdon, M. P. Frosch and B. T. Hyman (2010). "Beneficial effect of human anti-amyloid-beta active immunization on neurite morphology and tau pathology." *Brain* **133**(Pt 5): 1312-1327.

Shahpasand, K., I. Uemura, T. Saito, T. Asano, K. Hata, K. Shibata, Y. Toyoshima, M. Hasegawa and S. Hisanaga (2012). "Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease." *J Neurosci* **32**(7): 2430-2441.

Shankar, G. M., S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini and D. J. Selkoe (2008). "Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." *Nat Med* **14**(8): 837-842.

Shankar, G. M. and D. M. Walsh (2009). "Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β ." *Mol Neurodegener* **4**: 48.

Shaye, D. D. and I. Greenwald (2011). "OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs." *PLoS One* **6**(5): e20085.

Shi, C., X. Zhu, J. Wang and D. Long (2014). "Intromitochondrial IkappaB/NF-kappaB signaling pathway is involved in amyloid beta peptide-induced mitochondrial dysfunction." J Bioenerg Biomembr **46**(5): 371-376.

Silhankova, M. and H. C. Korswagen (2007). "Migration of neuronal cells along the anterior-posterior body axis of *C. elegans*: Wnts are in control." Curr Opin Genet Dev **17**(4): 320-325.

Sjoberg, M. K., E. Shestakova, Z. Mansuroglu, R. B. Maccioni and E. Bonnefoy (2006). "Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization." J Cell Sci **119**(Pt 10): 2025-2034.

Small, D. H., H. L. Clarris, T. G. Williamson, G. Reed, B. Key, S. S. Mok, K. Beyreuther, C. L. Masters and V. Nurcombe (1999). "Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **1**(4-5): 275-285.

Smith, M. A., G. Casadesus, J. A. Joseph and G. Perry (2002). "Amyloid-beta and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain." Free Radic Biol Med **33**(9): 1194-1199.

Song, Q. (2012). "Bursicon, a Neuropeptide Hormone that Controls Cuticle Tanning and Wing Expansion." Insect Endocrinology: 93-105.

Soto, C. (2003). "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **4**(1): 49-60.

Spillantini, M. G., J. R. Murrell, M. Goedert, M. R. Farlow, A. Klug and B. Ghetti (1998). "Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7737-7741.

Spires, T. L., J. D. Orne, K. SantaCruz, R. Pitstick, G. A. Carlson, K. H. Ashe and B. T. Hyman (2006). "Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy." Am J Pathol **168**(5): 1598-1607.

Spracklin, G., B. Fields, G. Wan, D. Becker, A. Wallig, A. Shukla and S. Kennedy (2017). "The RNAi Inheritance Machinery of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **206**(3): 1403-1416.

Stamer, K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (2002). "Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress." J Cell Biol **156**(6): 1051-1063.

Steele, J. C., J. C. Richardson and J. Olszewski (1964). "Progressive Supranuclear Palsy. A Heterogeneous Degeneration Involving the Brain Stem, Basal Ganglia and Cerebellum with Vertical Gaze and Pseudobulbar Palsy, Nuchal Dystonia and Dementia." Arch Neurol **10**: 333-359.

Stiernagle, T. (2006). "Maintenance of *C. elegans*." WormBook: 1-11.

Storey, E., T. Spurck, J. Pickett-Heaps, K. Beyreuther and C. L. Masters (1996). "The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites." Brain Res **735**(1): 59-66.

Suh, Y. H. and F. Checler (2002). "Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease." Pharmacol Rev **54**(3): 469-525.

Sulston, J. E., D. G. Albertson and J. N. Thomson (1980). "The *Caenorhabditis elegans* male: postembryonic development of nongonadal structures." Dev Biol **78**(2): 542-576.

Sulston, J. E. and H. R. Horvitz (1977). "Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **56**(1): 110-156.

Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White and J. N. Thomson (1983). "The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **100**(1): 64-119.

Sultan, A., F. Nessler, M. Violet, S. Begard, A. Loyens, S. Talahari, Z. Mansuroglu, D. Marzin, N. Sergeant, S. Humez, M. Colin, E. Bonnefoy, L. Buee and M. C. Galas (2011). "Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection." J Biol Chem **286**(6): 4566-4575.

Szczepanik, A. M., D. Rampe and G. E. Ringheim (2001). "Amyloid-beta peptide fragments p3 and p4 induce pro-inflammatory cytokine and chemokine production in vitro and in vivo." J Neurochem **77**(1): 304-317.

Tai, H. C., B. Y. Wang, A. Serrano-Pozo, M. P. Frosch, T. L. Spires-Jones and B. T. Hyman (2014). "Frequent and symmetric deposition of misfolded tau oligomers within presynaptic and postsynaptic terminals in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol Commun **2**: 146.

Takeda, A., M. A. Smith, J. Avila, A. Nunomura, S. L. Siedlak, X. Zhu, G. Perry and L. M. Sayre (2000). "In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with A β 50, an epitope of tau induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification." J Neurochem **75**(3): 1234-1241.

Talimat-Amar, Y., Y. Arribat, C. Redt-Clouet, S. Feuillette, A. L. Bouge, M. Lecourtois and M. L. Parmentier (2011). "Important neuronal toxicity of microtubule-bound Tau in vivo in *Drosophila*." Hum Mol Genet **20**(19): 3738-3745.

Tang, Z., E. Iojă, E. Bereczki, K. Hultenby, C. Li, Z. Guan, B. Winblad and J. J. Pei (2015). "mTor mediates tau localization and secretion: Implication for Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1853**(7): 1646-1657.

Tapia-Rojas, C., F. Cabezas-Opazo, C. A. Deaton, E. H. Vergara, G. V. W. Johnson and R. A. Quintanilla (2019). "It's all about tau." Prog Neurobiol **175**: 54-76.

Tashiro, K., M. Hasegawa, Y. Ihara and T. Iwatsubo (1997). "Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex." Neuroreport **8**(12): 2797-2801.

Thinakaran, G. and E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." J Biol Chem **283**(44): 29615-29619.

Torroja, L., H. Chu, I. Kotovsky and K. White (1999). "Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport." Curr Biol **9**(9): 489-492.

Trinczek, B., A. Ebner, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (1999). "Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles." J Cell Sci **112 (Pt 14)**: 2355-2367.

Trojanowski, J. Q. and V. M. Lee (1995). "Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases." FASEB J **9**(15): 1570-1576.

Tu, S., S. Okamoto, S. A. Lipton and H. Xu (2014). "Oligomeric Abeta-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **9**: 48.

Ullrich, A., A. Gray, A. W. Tam, T. Yang-Feng, M. Tsubokawa, C. Collins, W. Henzel, T. Le Bon, S. Kathuria, E. Chen and et al. (1986). "Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity." EMBO J **5**(10): 2503-2512.

Utton, M. A., J. Connell, A. A. Asuni, M. van Slegtenhorst, M. Hutton, R. de Silva, A. J. Lees, C. C. Miller and B. H. Anderton (2002). "The slow axonal transport of the microtubule-associated

protein tau and the transport rates of different isoforms and mutants in cultured neurons." J Neurosci **22**(15): 6394-6400.

Utton, M. A., W. J. Noble, J. E. Hill, B. H. Anderton and D. P. Hanger (2005). "Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein." J Cell Sci **118**(Pt 20): 4645-4654.

Vershinin, M., B. C. Carter, D. S. Razafsky, S. J. King and S. P. Gross (2007). "Multiple-motor based transport and its regulation by Tau." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 87-92.

Villemagne, V. L., S. Burnham, P. Bourgeat, B. Brown, K. A. Ellis, O. Salvado, C. Szoeki, S. L. Macaulay, R. Martins, P. Maruff, D. Ames, C. C. Rowe, C. L. Masters, B. Australian Imaging and G. Lifestyle Research (2013). "Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study." Lancet Neurol **12**(4): 357-367.

Villemagne, V. L., K. E. Pike, G. Chetelat, K. A. Ellis, R. S. Mulligan, P. Bourgeat, U. Ackermann, G. Jones, C. Szoeki, O. Salvado, R. Martins, G. O'Keefe, C. A. Mathis, W. E. Klunk, D. Ames, C. L. Masters and C. C. Rowe (2011). "Longitudinal assessment of Abeta and cognition in aging and Alzheimer disease." Ann Neurol **69**(1): 181-192.

Violet, M., L. Delattre, M. Tardivel, A. Sultan, A. Chauderlier, R. Caillierez, S. Talahari, F. Nessler, B. Lefebvre, E. Bonnefoy, L. Buee and M. C. Galas (2014). "A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions." Front Cell Neurosci **8**: 84.

Vossel, K. A., K. Zhang, J. Brodbeck, A. C. Daub, P. Sharma, S. Finkbeiner, B. Cui and L. Mucke (2010). "Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport." Science **330**(6001): 198.

Wang, C., V. Saar, K. L. Leung, L. Chen and G. Wong (2018). "Human amyloid beta peptide and tau co-expression impairs behavior and causes specific gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*." Neurobiol Dis **109**(Pt A): 88-101.

Wang, H., L. Fan, H. Wang, X. Ma and Z. Du (2015). "Amyloid beta regulates the expression and function of AIP1." J Mol Neurosci **55**(1): 227-232.

Wang, J., C. Zhao, A. Zhao, M. Li, J. Ren and X. Qu (2015). "New insights in amyloid beta interactions with human telomerase." J Am Chem Soc **137**(3): 1213-1219.

Wang, Y. and E. Mandelkow (2016). "Tau in physiology and pathology." Nat Rev Neurosci **17**(1): 5-21.

Ward, S., N. Thomson, J. G. White and S. Brenner (1975). "Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*." J Comp Neurol **160**(3): 313-337.

Wataya, T., A. Nunomura, M. A. Smith, S. L. Siedlak, P. L. Harris, S. Shimohama, L. I. Szveda, M. A. Kaminski, J. Avila, D. L. Price, D. W. Cleveland, L. M. Sayre and G. Perry (2002). "High molecular weight neurofilament proteins are physiological substrates of adduction by the lipid peroxidation product hydroxynonenal." J Biol Chem **277**(7): 4644-4648.

Watson, G. S. and S. Craft (2003). "The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment." CNS Drugs **17**(1): 27-45.

Webster, S. J., A. D. Bachstetter, P. T. Nelson, F. A. Schmitt and L. J. Van Eldik (2014). "Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models." Front Genet **5**: 88.

Weidemann, A., S. Eggert, F. B. Reinhard, M. Vogel, K. Paliga, G. Baier, C. L. Masters, K. Beyreuther and G. Evin (2002). "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing." Biochemistry **41**(8): 2825-2835.

Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1858-1862.

Whalen, B. M., D. J. Selkoe and D. M. Hartley (2005). "Small non-fibrillar assemblies of amyloid beta-protein bearing the Arctic mutation induce rapid neuritic degeneration." Neurobiol Dis **20**(2): 254-266.

White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson and S. Brenner (1976). "The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **275**(938): 327-348.

White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson and S. Brenner (1983). "Factors that determine connectivity in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **48 Pt 2**: 633-640.

White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson and S. Brenner (1986). "The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **314**(1165): 1-340.

Whiteman, I. T., O. L. Gervasio, K. M. Cullen, G. J. Guillemin, E. V. Jeong, P. K. Witting, S. T. Antao, L. S. Minamide, J. R. Bamburg and C. Goldsberry (2009). "Activated actin-depolymerizing factor/cofilin sequesters phosphorylated microtubule-associated protein during the assembly of alzheimer-like neuritic cytoskeletal striations." J Neurosci **29**(41): 12994-13005.

Wittmann, C. W., M. F. Wszolek, J. M. Shulman, P. M. Salvaterra, J. Lewis, M. Hutton and M. B. Feany (2001). "Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles." Science **293**(5530): 711-714.

Wong, C. W., V. Quaranta and G. G. Glenner (1985). "Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(24): 8729-8732.

Wood, J. G., B. Rogina, S. Lavu, K. Howitz, S. L. Helfand, M. Tatar and D. Sinclair (2004). "Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans." Nature **430**(7000): 686-689.

Wu, J. W., S. A. Hussaini, I. M. Bastille, G. A. Rodriguez, A. Mrejeru, K. Rilett, D. W. Sanders, C. Cook, H. Fu, R. A. Boonen, M. Herman, E. Nahmani, S. Emrani, Y. H. Figueroa, M. I. Diamond, C. L. Clelland, S. Wray and K. E. Duff (2016). "Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo." Nat Neurosci **19**(8): 1085-1092.

Yamazaki, M., I. Nakano, O. Imazu, R. Kaieda and A. Terashi (1994). "Astrocytic straight tubules in the brain of a patient with Pick's disease." Acta Neuropathol **88**(6): 587-591.

Yankner, B. A., L. R. Dawes, S. Fisher, L. Villa-Komaroff, M. L. Oster-Granite and R. L. Neve (1989). "Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease." Science **245**(4916): 417-420.

Yoshikai, S., H. Sasaki, K. Doh-ura, H. Furuya and Y. Sakaki (1990). "Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene." Gene **87**(2): 257-263.

Yuan, A., A. Kumar, C. Peterhoff, K. Duff and R. A. Nixon (2008). "Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice." J Neurosci **28**(7): 1682-1687.

Zarkower, D. (2006). "Somatic sex determination." WormBook: 1-12.

Zempel, H., E. Thies, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (2010). "Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines." J Neurosci **30**(36): 11938-11950.

Zhang, Y. W., R. Thompson, H. Zhang and H. Xu (2011). "APP processing in Alzheimer's disease." Mol Brain **4**: 3.

Zhao, L. N., H. Long, Y. Mu and L. Y. Chew (2012). "The toxicity of amyloid beta oligomers." Int J Mol Sci **13**(6): 7303-7327.

Zheng, S. Q., A. J. Ding, G. P. Li, G. S. Wu and H. R. Luo (2013). "Drug absorption efficiency in *Caenorhabditis elegans* delivered by different methods." PLoS One **8**(2): e56877.

Zhou, F., M. A. Smith, R. J. Castellani, R. Stimmelmayer, G. Perry, K. L. Drew and X. Zhu (2001). "Hibernation, a Model of Neuroprotection." ScientificWorldJournal **1**: 108.

Zhu, X., A. K. Raina, C. A. Rottkamp, G. Aliev, G. Perry, H. Boux and M. A. Smith (2001). "Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease." J Neurochem **76**(2): 435-441.

Zhu, X., C. A. Rottkamp, H. Boux, A. Takeda, G. Perry and M. A. Smith (2000). "Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **59**(10): 880-888.