

Université de Montréal

**Contribution de Filamine A dans l'accumulation de Tau dans la maladie
d'Alzheimer**

Par
Stéphanie Levert

Département de Neurosciences
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc)
en Neurosciences

Avril 2022

© Stéphanie Levert, 2022

Université de Montréal

Département de Neurosciences

Faculté Médecine des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Contribution de Filamine A dans l'accumulation de Tau dans la maladie d'Alzheimer

Présenté par :

Stephanie Levert

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Martine Tétreault

Présidente-rapporteur

Dre Nicole Leclerc

Directrice de recherche

Dr Jonathan Brouillette

Membre du jury

Résumé

Dans la maladie d'Alzheimer (MA), Tau, une protéine associée aux microtubules axonaux (MAPs), devient hyperphosphorylée, s'accumule et s'auto-agrège dans le compartiment somato-dendritique. L'accumulation de Tau hyperphosphorylée, et de ses agrégats, est aussi retrouvée dans d'autres maladies neurodégénératives appelées tauopathies, tel que les dégénérescences lobaires frontotemporales (FTLD-Tau). Malheureusement, les mécanismes menant à l'accumulation de Tau sont mal connus. Notre hypothèse est que la Tau hyperphosphorylée interagit avec un complexe protéique qui réduit sa dégradation par le protéasome et/ou l'autophagie. Des études ont rapporté la présence de filamine A (FLNA), une protéine de liaison à l'actine, dans les agrégats de Tau. Il a été démontré que FLNA peut nuire à la dégradation des protéines auxquelles elle se lie. Nos résultats obtenus sur une cohorte de 60 individus ont révélé une augmentation de la FLNA insoluble dans les cerveaux MA. Dans la lignée cellulaire de neuroblastome (N2a), nous avons détecté une interaction entre la région 214-441 acides aminés (a.a.) de Tau et FLNA par co-immunoprécipitation (GFP-Trap et MYC-Trap). Nous avons aussi montré, dans les cellules N2a, que la surexpression de FLNA provoquait l'accumulation intracellulaire des formes de Tau sauvages (ON3R et ON4R), de Tau phosphorylée aux sites S199-202 et T231/S235 et de Tau clivée par la caspase 3 (Tau-C3) mais pas de la Tau agrégée. La surexpression de FLNA a également augmenté l'accumulation intracellulaire des formes mutantes de Tau, P301L, V337M, et R406W, associées aux FTLD-Tau. Des analyses par RTqPCR ont montré que l'accumulation intracellulaire de Tau n'est pas causée par une augmentation de son expression génique. De plus, les augmentations intracellulaires des protéines interagissant avec FLNA (Annexine II) et l'absence d'effets sur les protéines (GFP et VAMP8) qui n'interagissent pas avec FLNA nous indiquent que l'interaction joue un rôle important dans l'accumulation de Tau lors de la surexpression de FLNA. Par la suite, nous avons examiné si FLNA augmentait l'accumulation intracellulaire de Tau en nuisant à sa dégradation. L'ubiquitination jouant un rôle important dans la dégradation de Tau, nous avons examiné si celle-ci était diminuée en

présence de FLNA. L'immunoprécipitation des protéines ubiquitinylées a montré que la surexpression de FLNA n'affectait pas l'ubiquitylation de Tau. Finalement, nos résultats ont révélé que la Tau était capable de stabiliser les microtubules lors de la surexpression de FLNA. Ceci indique que l'interaction de Tau avec FLNA ne nuit pas à son interaction avec les microtubules. En conclusion, nos résultats ont démontré que l'interaction de Tau avec FLNA contribue à son accumulation intracellulaire, son hyperphosphorylation ainsi que son clivage par la caspase-3, mais pas à son auto-agrégation dans notre modèle neuronal. La prévention de cette interaction pourrait réduire l'accumulation de Tau ainsi que ses effets pathologiques dans les neurones.

Mots-clés: Alzheimer, Tauopathie, Hyperphosphorylation, Tau intracellulaire, Filamine

Abstract

In Alzheimer disease (AD), tau, an axonal microtubule associated protein (MAPs), becomes hyperphosphorylated, accumulates and self-aggregates in the somato-dendritic compartment. The accumulation of hyperphosphorylated and aggregated tau is also seen in other neurodegenerative diseases called tauopathies such as frontotemporal lobar degeneration (FTLD-Tau). Unfortunately, the mechanisms leading to tau accumulation remain poorly understood. Our hypothesis is that hyperphosphorylated tau interacts with a protein complex that reduces its degradation by the proteasome and/or autophagy. Studies reported the presence of filamin A (FLNA), an actin binding protein, in tau aggregates. FLNA was observed to reduce the degradation of proteins to which it binds. Our results obtained on a cohort of 60 subjects revealed an increase in insoluble FLNA in AD brains. In the neuroblastoma cell line (N2a), we detected an interaction between 214-441 amino acids (a.a.) of tau and FLNA by immunoprecipitation (GFP-Trap and MYC-Trap). We also demonstrated that FLNA overexpression increased intracellular wild-type tau (0N3R and 0N4R), phosphorylated tau at sites S199-202 and T231/S235 and caspase-3 cleaved tau (Tau-C3) but not aggregated tau. The overexpression of FLNA also increased the intracellular accumulation of mutated tau forms, P301L, V337M, and R406W associated to FTLD-Tau. RTqPCR analysis revealed that the intracellular accumulation of tau was not caused by an increase of *MAPT* gene expression. The intracellular accumulation of proteins known to interact with FLNA (Annexin II) and the absence of intracellular accumulation of proteins that do not interact with FLNA (GFP and VAMP8) indicated that the interaction tau with FLNA played a role in its intracellular accumulation. We then examined whether FLNA increased tau accumulation by impairing its degradation. Ubiquitination plays an important role in tau degradation. Based on this, we examined whether tau ubiquitination was decreased upon FLNA overexpression. Immunoprecipitation of ubiquitylated proteins revealed that FLNA overexpression did not affect tau ubiquitylation. Lastly, our results revealed that tau was able to stabilize microtubules upon FLNA overexpression indicating that its interaction with FLNA did

prevent its binding to microtubules. Collectively, our results indicate that the interaction of FLNA with tau could contribute to the increase of pathological tau in AD and FTLN-Tau brain and preventing this interaction could reduce it and its pathological effects on neurons.

Keywords: Alzheimers, Tauopathy, Hyperphosphorylation, intracellular tau, Filamin

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Liste des Tableaux.....	ix
Liste de Figures.....	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xv
Chapitre 1: Introduction.....	1
1.1 La maladie d'Alzheimer.....	1
1.1.1 Découverte de la pathologie.....	1
1.1.2 Stades et symptômes cliniques de la maladie d'Alzheimer.....	1
1.1.3 Épidémiologie et coûts engendrés par l'Alzheimer.....	3
1.1.4 Facteurs de risques.....	4
1.1.5 Les causes de la maladie d'Alzheimer.....	10
1.2 La protéine Tau.....	13
1.2.1 Gène.....	13
1.2.2 Isoformes.....	14
1.2.3 Structure de Tau et fonctions de chaque domaine.....	15
1.2.4 Fonctions physiologiques.....	16
1.2.5 L'interactome de Tau.....	18
1.3 Tauopathies.....	23
1.3.1 Modifications post-traductionnelles.....	23
1.3.2 Agrégation.....	30
1.3.3 Dysfonctionnement causé par la Tau pathologique.....	33
1.3.4 Dégradation de Tau.....	34
1.3.5 Mutations de Tau.....	37
1.4 Modèles animaux et cellulaires pour l'étude de la MA.....	38
1.5 La filamine.....	43
1.5.1 Rôles et structure.....	43
1.5.2 Isoformes de filamine.....	44
1.5.3 Partenaires de liaison de FLNA.....	45
1.5.4 Mécanismes régulant l'activité de FLNA.....	46
1.5.5 Filaminopathies.....	47

1.5.6 FLNA dans la maladie d'Alzheimer	48
1.6. Objectifs et Hypothèses.....	49
Chapitre 2: Matériels et Méthodes	51
2.1 Échantillons de cerveau.....	51
2.1.1 Provenance des échantillons.....	51
2.1.3 Western Blot des fractions	52
2.2 Culture cellulaire.....	53
2.2.1 Ensemencements et transfections.....	53
2.2.2 Plasmides	54
2.2.3 Lyse cellulaire.....	55
2.2.4 Extraction d'ARN.....	55
2.3 Western Blot du lysat cellulaire	56
2.3.1 Western blot dénaturant.....	56
2.4 Immunoprécipitations	57
2.4.1 GFP-Trap.....	57
2.4.2 Western Blot GFP-Trap	58
2.4.3 Myc-Trap	58
2.4.4 Western Blot Myc-Trap	58
2.4.5 Ubiquitine-Trap.....	59
2.4.6 Western Blot Ubiquitine-Trap	60
2.5 Anticorps.....	60
2.6 Analyse de l'agrégation de Tau avec le Kit Cisbio.....	62
2.7 Analyses statistiques	62
2.7.1 Analyses des résultats des cerveaux de la cohorte	62
2.7.2 Analyses des résultats des lysats N2a.....	63
Chapitre 4: Discussion.....	91
4.1 Résumé des résultats.....	91
4.2 Augmentation de filamine A insoluble dans l'Alzheimer	92
4.3 L'interaction de FLNA est médiée par un domaine qui se trouve dans la région 215-441 a.a. de Tau.....	93
4.4 La surexpression de FLNA augmente l'accumulation intracellulaire de Tau sauvages et mutées.	94
4.5 Surexpression de FLNA n'affecte pas l'expression génique de Tau	96
4.6 L'interaction avec FLNA est importante pour l'accumulation intracellulaire.....	98

4.7 La surexpression de FLNA cause une accumulation de certaines formes de Tau phosphorylée et de sa forme clivée par la caspase-3, mais pas de Tau ubiquitylée et agrégée.....	101
4.8 L'accumulation de Tau par la surexpression de FLNA augmente la stabilisation des microtubules.	106
4.9 Avantages et limitations du modèle cellulaire	109
4.10 Perspectives futures et conclusions.....	110
Bibliographies	112

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Prévalence en pourcentage de la MA aux États-Unis et au Canada selon trois tranches d'âge.....	3
Tableau 2 : Mutations génétiques associées à une progression rapide de la MA.....	6
Tableau 3 : Tableau des anticorps primaires et secondaires avec leurs dilutions utilisées pour les Western Blots et Immunoprécipitations.....	61

Liste de Figures

Figure 1 : Symptômes les plus courants et la durée moyenne pour chacun des stades de la MA.	2
Figure 2: Facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer. Ceux-ci agissent de façon cumulative conduisant à la dégénérescence des voies neuronales entraînant la formation des plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires, les deux lésions les plus étudiées.	4
Figure 3: Formation de l'A β par le clivage de l'APP et son effet sur les différentes voies de signalisation ainsi que son accumulation dans la MA.	12
Figure 4 : Schéma du gène humain <i>MAPT</i> avec ces 16 exons situés sur le chromosome 17q21.31.	14
Figure 5. Isoformes de la protéine Tau dans le cerveau humain.	15
Figure 6 : Partenaires de liaison de Tau dont les interactions ont été cartographiées sur les régions de la protéine Tau.	20
Figure 7 : Proteomique de la Tau phosphorylée des NFTs.	22
Figure 8 : Les différentes modifications post-traductionnelles et leurs sites approximatifs sur la plus grande isoforme de Tau (2N4R, 441 a.a.).	23
Figure 9 : Clivage protéolytique et leurs sites approximatifs sur la plus grande isoforme de Tau (2N4R, 441 a.a.).	27
Figure 10 : Mécanisme d'agrégation de Tau et son accumulation dans la MA.	31
Figure 11 : Dégradation de Tau par le protéasome et par l'autophagie.	36
Figure 12 : Localisation des mutations sur la plus grande isoforme de Tau (2N4R, 441 a.a.).	37
Figure13: Structure de FLNA.	43

Figure 14: Partenaires de FLNA dont les domaines d'interactions ont été cartographiés sur la protéine FLNA.	45
Figure 15 : Fractionnement des échantillons de cerveaux.	52
Figure 16. Augmentation du niveau de iFLNA.	65
Figure 17. FLNA co-immunoprécipite avec Tau dans les cellules N2a.	67
Figure 18. Accumulation intracellulaire des isoformes 3R et 4R lors de la surexpression de FLNA.	70
Figure 19 : L'effet de FLNA sur l'expression de Tau.....	73
Figure 20 : L'interaction avec FLNA est importante pour l'accumulation intracellulaire.	77
Figure 21 : La surexpression de FLNA augmente l'accumulation intracellulaire de la Tau phosphorylée.	80
Figure 22 : La surexpression de FLNA augmente l'accumulation intracellulaire de la forme Tau clivée par la caspase-3.	82
Figure 23 : La surexpression de FLNA n'affecte pas l'ubiquitination de Tau.	84
Figure 24 : Augmentation de la tubuline acétylée lors de la surexpression de FLNA. ...	87
Figure 25 : Accumulation intracellulaire des Tau mutées lors de la surexpression de FLNA.	89

Liste des sigles et des abréviations

A.a : Acides aminés

A β : Amyloïde-bêta

ACh: Acétylcholine

AChE: Acétylcholinestérase

ADB: Domaine de liaison à l'actine

AEP : Enzyme asparagine endopeptidase

ANX II : Annexine A2

APOE4: Apolipoprotéine E4

APP: Protéine précurseur amyloïde

ARNm : ARN messenger

ARNsn : petits ARN nucléaires

ARNsno : petits ARN nucléolaires

AVs : Vacuoles autophagiques

BBB : Barrière hémato-encéphalique

BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

CBD : Démence cortico-basale

C. elegans : *Caenorhabditis elegans*

CH1: Domaines homologues à la Calponine 1

CH2: Domaines homologues à la Calponine 2

DT2: Diabète de type 2

eExon : Amplificateur d'exon

FLNA: Filamine A

FLNB: Filamine B

FLNC: Filamine C

FTLD-Tau: Démence lobaire frontotemporale-Tau

GPIb α : Glycoprotéine plaquettaire Ib alpha

HTRF : Fluorescence homogène en temps résolu

iFLNA : Filamine A insoluble
IgFLN: Modules d'immunoglobuline
IMC : Indice de masse corporelle
iPSCs : Cellules souches pluripotentes induites
iTau : Tau insoluble
MA: Maladie d'Alzheimer
MAPs: Protéines associées aux microtubules
MBRs : Domaines de liaison aux microtubules
MTs : Microtubules
N2a : Neuroblastome de souris
NFTs : Enchevêtrements neurofibrillaires
NGF : Facteur de croissance nerveuse
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
OPD: Otopalatodigital
PHFs : Filaments hélicoïdaux appariés
PRR : Région riche en proline
PSEN1: Préséniline-1
PSEN2: Préséniline-2
PSP: Paralyse supranucléaire progressive
PTMs : Modifications post-traductionnelles
ROS: Espèces réactive de l'oxygène
RQ : Quantité relative
SFs : Filaments droits
SH3 : Src homologue-3
sTau : Tau soluble
Tau-C3 : Tau clivé par la caspase- 3
TRL4 : Toll Like Receptor 4
UBD : Domaine de liaison de l'ubiquitine
UPS : Voie ubiquitine-protéasome

$\alpha 7$ nAChR: Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine $\alpha 7$

Remerciements

Je tiens à remercier plusieurs personnes, car sans eux les deux dernières années n'auraient pas été les mêmes.

Tout d'abord je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dre Nicole Leclerc, pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire et d'approfondir mes connaissances en neurosciences, particulièrement sur la maladie d'Alzheimer. J'ai appris que la science et le travail en laboratoire est le métier que j'ai toujours voulu faire.

Merci également aux membres de mon jury de mémoire, Dre Martine Tétreault et Dr Jonathan Brouillette pour la lecture et l'évaluation de ce mémoire. Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de parrainage, Dre Martine Tétreault et Dr Karl Fernandes, de m'avoir suivi et conseillé tout au long de mon projet. Un immense merci à David A. Bennett, Frédéric Calon et Cyntia Tremblay pour le partage et l'aide pour les résultats obtenus à partir des échantillons de cerveaux de la cohorte.

Un gros merci aux membres du laboratoire présents pendant ma maîtrise: Julie Pilliod, Camille Pernègre, Asma Bouikni, Étienne Aumont et Émilien Schramm. Merci pour tous vos conseils et votre bonne humeur quotidienne.

Merci à ma stagiaire d'été, Sandrine Armanville. Je te souhaite la plus belle des réussites dans ta maîtrise.

Pour finir, j'aimerais remercier mes parents Sylvie et Vincent ainsi que mes amis qui m'ont soutenu, écouté et encouragé tout au long de ces années de maîtrise. Un gros merci à Julie Pilliod, Quentin Osseman, Daphné Gilbert, Érik Gilbert, Marianne Fournier et Audrey Labarre pour votre support ainsi qu'un immense merci à Mélanie Côté-Cyr, Mathilde Fortier, Alex Grenier et Simon Bourret mes merveilleux scientifiques du baccalauréat.

Chapitre 1: Introduction

1.1 La maladie d'Alzheimer

1.1.1 Découverte de la pathologie

En 1901, Auguste Deter, une jeune femme âgée de 50 ans a été admise dans un hôpital psychiatrique par son mari due à l'apparition de plusieurs symptômes, tels que la paranoïa, un trouble du sommeil, trouble de la mémoire, de l'agressivité et de la confusion. Dû à son jeune âge, Auguste Deter fut diagnostiquée de démence présénile. Ce fut après son décès, 5 ans plus tard, que le clinicien psychiatrique et neuroanatomiste Alois Alzheimer put répertorier, lors de l'autopsie, la présence de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) (Hippius, H. 2003).

1.1.2 Stades et symptômes cliniques de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par une multitude de symptômes cognitifs, tels que des troubles de la mémoire, de la confusion, de la difficulté à communiquer, à accomplir des tâches et à résoudre des problèmes ainsi que des troubles du comportement et des sautes d'humeur. L'apparition des symptômes corrèle avec la progression de la maladie permettant ainsi de la caractériser en plusieurs stades. Dans la MA, on retrouve 4 stades : le stade asymptotique, précoce, modéré et sévère. Cependant, les différents stades peuvent se chevaucher causant une grande variabilité dans la présence des symptômes chez le malade (**Figure 1**). Le stade asymptotique peut durer plusieurs années et la personne ne présente pas de symptômes visibles. Cependant, un haut niveau de peptides amyloïdes-bêta ($A\beta$) et une diminution du métabolisme du glucose sont mesurables et peuvent être utilisés comme biomarqueurs de la MA. Pour ce qui est du stade précoce, la personne est encore autonome et peut

effectuer ses tâches du quotidien, comme aller travailler, conduire et faire des activités. Cependant, celle-ci commencera à développer de légers problèmes de mémoire, tels que l'oubli de mot ainsi que des problèmes de réflexion dans la planification et l'organisation des tâches quotidiennes. Le stade modéré peut durer plusieurs années et la personne sera sujette à des sautes d'humeur et à l'oubli d'événements récents. L'individu sera aussi dans l'incapacité d'effectuer des tâches complexes, comme préparer à manger, s'habiller et résoudre des problèmes, et sera sujet à beaucoup de confusions. Pour finir, une personne rendu au stade sévère de la MA n'ai plus du tout autonome. Elle ne peut plus différencier les visages familiers des visages inconnus et n'est plus capable de mener une conversation ou de communiquer ses émotions. De plus, l'individu développera plusieurs troubles majeurs du rythme du sommeil.

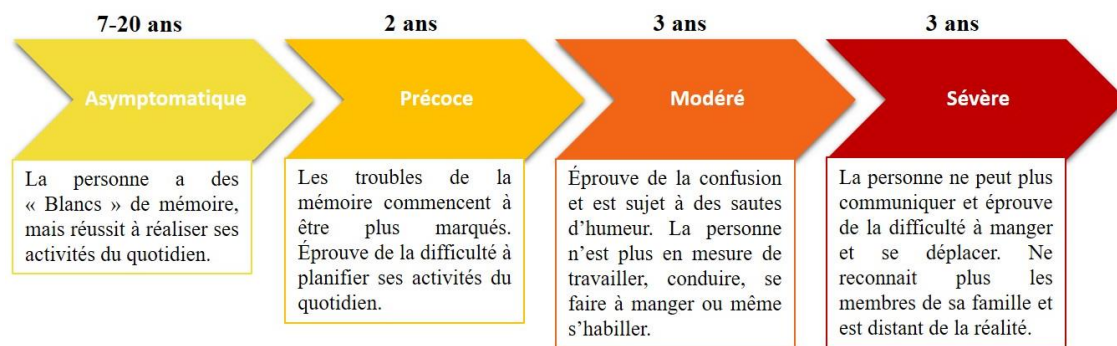


Figure 1 : Symptômes les plus courants et la durée moyenne pour chacun des stades de la MA.

1.1.3 Épidémiologie et coûts engendrés par l'Alzheimer

Selon le rapport de l'association d'Alzheimer 2019, plus de 50 millions de personnes seraient atteintes de démence dans le monde, dont 60-70% seraient atteintes de la MA. L'Amérique du Nord et l'Europe de l'Ouest sont les deux régions du monde ayant la prévalence la plus élevée pour les personnes âgées de plus de 60 ans atteintes de la MA (Mayeux, R. et Stern, Y., 2012). Selon le rapport 2020 de l'association Alzheimer et le rapport de la Société Canadienne de l'Alzheimer, 5,8 millions et 747 000 personnes sont atteintes de la MA aux États-Unis et au Canada respectivement. Les personnes âgées de plus de 75 ans représentent respectivement 83% et 72% des cas aux États-Unis et au Canada. La prévalence de la MA augmente considérablement avec l'âge (**Tableau 1**) (Alzheimer's association, 2020). En 2010, les coûts mondiaux regroupant les coûts directs (les soins médicaux et sociaux) ainsi que les coûts indirects (les soins non rémunérés par la famille et les amis) sont estimés à 604 milliards de dollars US (Wimo, A. et al., 2013). En 2020, la MA a engendré des coûts globaux de 305 milliards de dollars aux États-Unis et de 33 milliards de dollars au Canada. Selon les prévisions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de personnes atteintes de la MA devrait presque doubler d'ici 20 ans.

Tableau 1 : Prévalence en pourcentage de la MA aux États-Unis et au Canada selon trois tranches d'âge. (Produit à partir du rapport 2020 de l'Alzheimer's association et du rapport 2020 de la Société Canadienne de l'Alzheimer)

Prévalence (%)		
	États-Unis	Canada
65-74 ans	3	3.2
75-84 ans	17	18.3
85 ans et plus	32	24.6

1.1.4 Facteurs de risques

Les facteurs de risques augmentent la probabilité de contracter une maladie. Certains facteurs de risques sont non modifiables tels que l'âge, l'historique familial et la génétique tandis que d'autres sont modifiables tels que la santé physique et mentale ainsi que le mode de vie de l'individu (**Figure 2**).

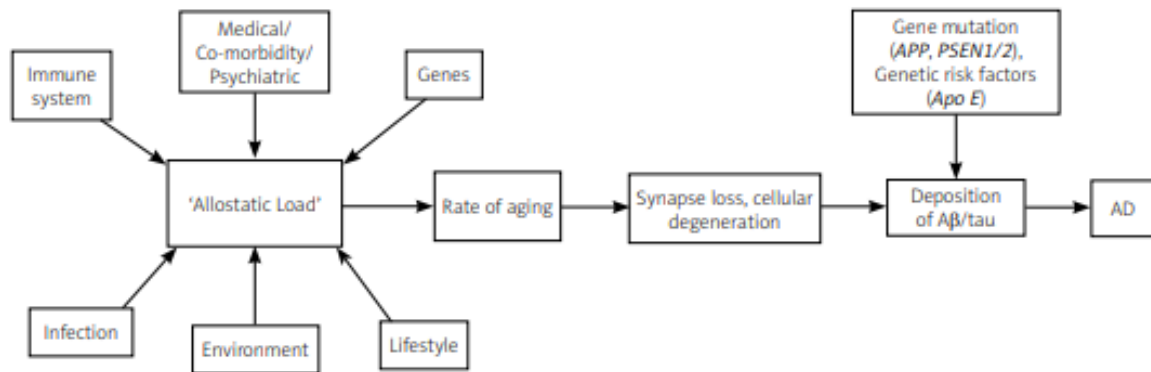


Figure 2: Facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer. Ceux-ci agissent de façon cumulative conduisant à la dégénérescence des voies neuronales entraînant la formation des plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires, les deux lésions les plus étudiées. (Armstrong, R.A. 2019)

1.1.4.1 Facteurs de risques non modifiables génétiques

Âge et genre

L'âge n'est pas une cause directe de la MA, mais il est un des facteurs de risque le plus important. Tout individu augmente son risque de développer la maladie après 65 ans (Richartz-Salzbunger, E. et al., 2010; Armstrong, R.A., 2019). Au Canada, 1 personne sur 20, âgée de plus de 65 ans, est atteinte de la MA. Cette proportion augmente à 1 personne sur 4 pour les plus de 85 ans. Le risque de développer la maladie double tous les 5 ans à partir de 65 ans. Plus rarement, il est possible de développer la MA à 40-50 ans, connue

sous le nom d'Alzheimer précoce. Au Canada environ 16 000 personnes en sont atteintes. Le genre est aussi un facteur non modifiable dans la MA. Deux tiers des personnes atteintes de la MA sont des femmes. Cette incidence plus élevée est causée par un ensemble de facteurs de risques modifiables qui sont plus courant chez les femmes que chez les hommes (Mielke, M.M, 2019). Par exemple, au cours des derniers siècles, le niveau d'éducation était moins élevé chez les femmes et elles avaient moins accès aux études supérieures. En effet, une étude récente a montré qu'une durée d'éducation plus longue à un impact sur la réserve cognitive. Cette étude a aussi montré que la réserve cérébrale chez les patients MA était beaucoup moins élevée que les patients témoins (Wada, M. et al., 2018). Les femmes étaient aussi plus à risque d'isolement social, puisqu'elles devaient rester au domicile familial pour effectuer les tâches ménagères et s'occuper des enfants. Pour finir, une étude a montré que la diminution avec l'âge de l'œstrogène aurait un impact sur le développement de la MA, puisque cette hormone protège contre la toxicité mitochondriale de l'A β (Vina, J. et Lloret, A., 2010).

Génétique

Un individu ayant de très forts antécédents familiaux d'Alzheimer (plusieurs membres de leur famille sur plusieurs générations) a une incidence de risque plus élevé, car ces cas peuvent être causés par des mutations dans des gènes héréditaires. Les gènes les plus souvent retrouvés mutés dans les cas de la MA familiale sont la protéine précurseur de l'amyloïde (*APP*), de la préséniline 1 (*PSEN1*) et de la préséniline 2 (*PSEN2*). La présence de l'allèle apolipoprotéine E4 (*APOE4*) est aussi un des facteurs de risque génétique le plus important dans la MA. 25 à 30% de la population est porteur de l'allèle *APOE4*. Cependant, ce n'est pas tous les porteurs de cet allèle qui développeront la maladie (Société Canadienne de l'Alzheimer, 2018). Une étude a montré que d'autres gènes mutés sont associés à la MA, tels que *CHRNE*, *PRKD3/NDUFAF7*, *PLCG2* et *SHARPIN* (de Rojas, I. et al., 2021). De plus, une revue de la littérature a rassemblé une liste de plusieurs gènes mutés associés à une progression plus rapide de la MA (**Tableau 2**). Les

cas familiaux peuvent développer la MA à tout âge et auront les mêmes symptômes que les cas sporadiques (absence de mutations des gènes mentionnés). Cependant, ces cas représentent que 2 à 5% des personnes atteintes de la MA.

Tableau 2. Mutations génétiques associées à une progression rapide de la MA. (Produit à partir de Loeffler, D.A., 2021)

Syndrome de Down

Gènes	
A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 19 (ADAM19)	Interleukin-1 α (IL-1 α)
Apolipoprotein E (APOE)	Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C)
ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7 (ABCA7)	Paired Box Gene 3 (PAX3)
Carbon Catabolite Repression 4-Like (CCRN4L)	Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class Q (PIGQ)
Cas Scaffold Protein Family Member 4 (CASS4)	Presenilin 1 (PSEN1)
CD33	Presenilin 2 (PSEN2)
Clusterin (CLU)	Prion Protein (PRNP)
Complement Receptor 1 (CR1)	Protein Phosphatase 2B (PP2B)
Cystatin 3 (CST3)	Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP)
Ephrin Type-A Receptor 1 (EPHA1)	Saitohin
Exocyst Complex Component 3-Like 2 (EXOC3L2)	Sortilin-related receptor (SORL1)
FS-7-Associated Surface Antigen (FAS)	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 (TREM2)
Glis Family Zinc Finger 1 (GLIS1)	

Les personnes souffrant du Syndrome de Down sont plus à risque de développer la maladie d'Alzheimer dues à leurs trois copies du chromosome 21, sur lequel on retrouve le gène codant l'APP. Le chromosome surnuméraire augmente les risques de produire les peptides A β de 40 et 42 acides aminés (A β 40 et A β 42) par le mauvais clivage de l'APP (Lott, I.T et Head, E., 2021).

1.1.4.2 Facteurs de risque modifiable

Comorbidités

Plusieurs études ont montré un fort lien entre les maladies vasculaires et la MA. L'activité et l'intégrité du cerveau sont assurées par le réseau cérébrovasculaire et par les mécanismes de contrôle neurovasculaire. Une étude a montré un niveau élevé de plaques A β et de NFTs ainsi qu'une atrophie de l'hippocampe dans les cerveaux de patients souffrant d'hypertension (Launer, L.J. et al., 2000). Il a aussi été observé que le risque de développer la MA est doublé après un accident vasculaire cérébral. De plus, les maladies cardiaques, telles que la fibrillation auriculaire, l'arythmie et l'arrêt cardiaque, augmentent les risques de développer la MA. Ceux-ci induisent une diminution de la perfusion et/ou l'oxygénation du cerveau ce qui mène à un dysfonctionnement cérébral et un déclin cognitif. L'obésité est un facteur de risque important dans le développement de maladies vasculaires et une forte corrélation entre l'obésité et le risque de développer la MA a été observée. L'obésité produit un changement métabolique chez l'individu et peut altérer les plasticités neuronales endommageant ainsi le système nerveux. L'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) est proportionnelle à l'augmentation des risques de développer la MA (Mazon, J.N et al., 2017; Tolppanen, A.M. et al., 2014). L'obésité augmente aussi les risques de développer le diabète de types 2 (DT2). Le DT2 est caractérisé principalement par une hyper-insulinémie, une résistance à l'insuline et à des troubles du métabolisme du glucose. L'insuline joue un rôle important dans la neuromodulation (Kappelle, L. et Biessels, G., 2005). Une diminution des

récepteurs de l'insuline ainsi que de leurs sensibilités perturbe le système cholinergique, la dégradation de l'A β et l'altération de l'activité des kinases, telles que MAPK, akt et GSK-3 β (Frölich, L. et al., 1998; Sims-Robinson et al., 2010; Rivera, E.J et al., 2005). Dans la population mondiale, plus de 30 millions de personnes souffrent de diabète, dont 90% à 95% sont des DT2 (U.S. Dept of Health and Human Services, 2017). Les individus ayant le DT2 ont 60% de risque de plus de développer la MA que les individus ne souffrant pas de diabète (Chatterjee, S. et al., 2016). De plus, une augmentation des niveaux de plaques A β et de NFTs dans l'hippocampe a été observée dans des cerveaux d'individus souffrant de DT2 (Miklossy, J. et al., 2010).

Dépression et Stress

La dépression est connue comme facteur aggravant la MA. Cependant des études ont observé que la dépression à un jeune âge ou en début de l'âge adulte augmentait les risques de développer la MA. Une étude épidémiologique récente a montré un plus grand nombre de cas MA dans le groupe d'individus souffrant de dépression que dans le groupe témoin (Tao, P. et al., 2019). Les neurotransmetteurs affectés dans la dépression, soit la dopamine et la sérotonine, sont aussi affectés dans la MA (Jacobsen, J.P. et al., 2012). Une diminution de la dopamine produit un dysfonctionnement au niveau des neurones dopaminergiques et la diminution de la sérotonine cause une augmentation du niveau des peptides A β (Nobili, A. et al., 2017; Nelson, R.L. et al., 2007). Le stress est le facteur de risque le plus étudié dans le développement de la dépression. Il a été montré que le stress joue un certain rôle dans le développement de la MA (Yuede, C.M. et al., 2018). Le stress aigu et le stress chronique augmente le niveau de Tau phosphorylée chez les rongeurs (Filipcik, P. et al., 2012; Kvetnansky, R. et al., 2016; Yan, J. et al., 2010; Yang, C. et al., 2014). Il a aussi été démontré, chez les rongeurs, que le stress aigu et chronique augmente la production de peptides A β stimulant ainsi la formation de plaques A β (Martisova, E. et al., 2013; Pietrzak, R.H. et al., 2015).

Tabagisme et alcool

Il a été démontré que le tabagisme est un facteur de risque important dans les maladies vasculaires, qui est un facteur de risque pour la MA (Edwards III, G.A. et al., 2019). Les individus fumant la cigarette augmentent de 45% leur risque de développer la MA. De plus, le tabac contient des niveaux élevés de métaux. Une étude récente a montré que certains métaux dans le tabac augmentent le niveau de NFTs ainsi que l'agrégation des peptides A β (Wallin, C. et al., 2017). Pour finir, le tabagisme est associé à une augmentation de la production des radicaux libres, du stress oxydatif et l'activation de la réaction pro inflammatoire du système immunitaire qui sont tous des mécanismes jouant un rôle important dans la MA (Edwards III, G.A. et al., 2019). La consommation chronique d'alcool a aussi été démontrée comme un facteur de risque dans le développement de la MA. La consommation excessive d'éthanol entraîne une augmentation du stress oxydatif ainsi qu'une altération des voies de signalisation intracellulaire par la réduction de la disponibilité au facteur de croissance neuronale (NGF) et du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Yang, Q. et al, 2020; Hammoud, N et Jimenez-Shahed, J., 2019). La consommation excessive d'éthanol entraîne aussi une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BBB) en interagissant avec les neurotransmetteurs ce qui entraîne un dysfonctionnement et des lésions cérébrales (Gushcha, V.K. et al., 2019). Pour finir, des études ont montré qu'un niveau élevé d'alcool augmente la production et l'accumulation des peptides A β ainsi qu'une augmentation de Tau phosphorylée dans des cultures cellulaires ainsi que dans le modèle de souris transgénique (Huang, D. et al, 2017; Hoffman, J.L. et al., 2019).

1.1.5 Les causes de la maladie d'Alzheimer

La MA peut être diagnostiquée par l'évaluation conjointe des symptômes cliniques et d'une évaluation neuropathologique post-mortem. L'évaluation neuropathologique permet d'observer les deux principaux types de lésions : les plaques amyloïdes constituées de peptides A β et les NFTs constitués d'agrégats de la protéine Tau hyperphosphorylée.

1.1.5.1 Le peptide amyloïde-bêta et les plaques amyloïdes

En condition physiologique, l'APP, une glycoprotéine transmembranaire, est clivée de façon séquentielle par les enzymes α et γ sécrétases libérant ainsi le fragment P3 et le domaine intracellulaire de l'APP. Le bon clivage de l'APP est important, puisque celui-ci joue plusieurs fonctions dans la synaptogenèse, la migration neuronale, l'adhésion et la signalisation cellulaire (Chen, G.F. et al., 2017). Cependant, dans la MA, l'APP, est clivée de façon séquentielle et anormale par les enzymes β et γ sécrétases formant ainsi les A β 40 et A β 42 (**Figure 3(A)**) (Kumar, A. et Ekavali, S.A., 2015). De plus, la γ sécrétase est régulée par PSEN1 et PSEN2. La mutation de ces trois gènes est majoritairement retrouvée dans la MA de type familial. Cependant, dans la MA de type sporadique (absence de mutations) d'autres facteurs induisent l'augmentation du clivage par les enzymes β et γ sécrétases. Dans la MA, la forme retrouvée en plus grande quantité est l'A β 42 dû à son haut taux de fibrillation et d'insolubilité une fois agrégée (Masters, C.L. et al., 2015). Ces monomères A β peuvent par la suite s'agréger en divers types d'assemblage, tels qu'en oligomères, en protofibrilles et en fibrilles amyloïdes (**Figure 3(B)**). Les fibrilles amyloïdes sont le composant principal des plaques amyloïdes. Cependant, les oligomères A β sont très solubles ce qui leurs permettent d'être diffuser dans le cerveau. Cela leurs permettent d'interagir avec plusieurs récepteurs activant ainsi des voies de signalisation qui induisent la production des espèces réactives de l'oxygène

(ROS), l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et l'induction des réponses inflammatoires (**Figure 3(B)**) (Chen, G.F. et al., 2017). Dans la MA, la prolifération des plaques amyloïdes suit les cinq phases de Braak : la phase I où les plaques se situent dans les parties basales des lobes frontaux, temporaux et occipitaux; les phases II et III où les plaques se propagent dans toutes les zones isocorticales; et les phases IV et V où les plaques se propagent dans la couche moléculaire du cervelet et des noyaux sous-corticaux (**Figure 3(C)**) (Jouanne, M. et al., 2017).

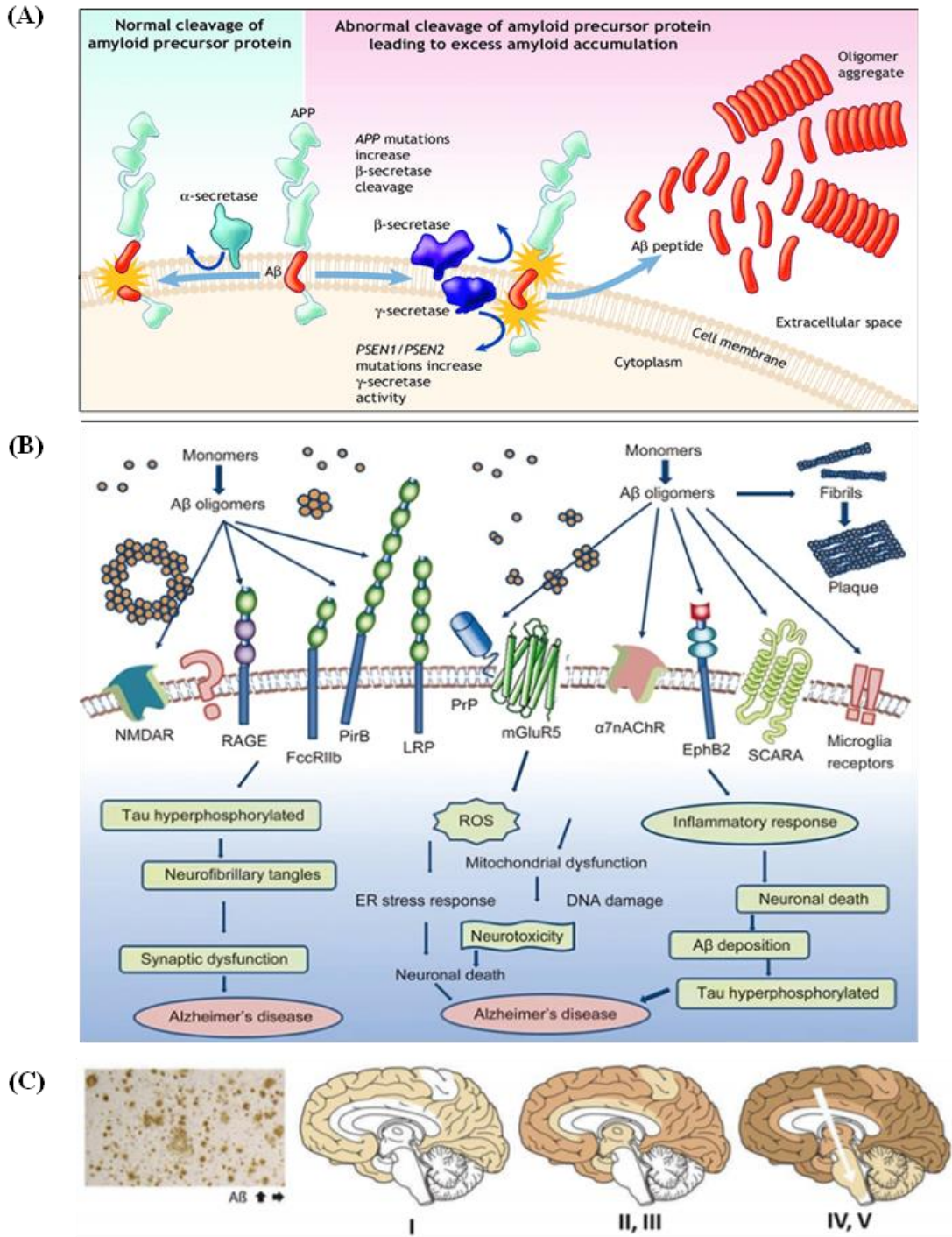


Figure 3: Formation de l'A β par le clivage de l'APP et son effet sur les différentes voies de signalisation ainsi que son accumulation dans la MA. (A) Clivage de l'APP dans sa condition physiologique et pathologique. (B) Assemblage de l'A β et ces effets sur les différentes voies de signalisation. (C) Les différents stades de l'accumulation des plaques A β dans la MA. (Patterson et al., 2008; Chen, G. et al., 2017 et Jouanne, M. et al., 2017)

1.2 La protéine Tau

La protéine Tau fait partie de la superfamille des protéines associées aux microtubules (MAPs) et est retrouvée dans plusieurs espèces animales, telles que la drosophile, le *Caenorhabditis elegans*, les rongeurs, les bovins, les chèvres, les singes ainsi que les humains. Chez l'homme, la Tau est retrouvée majoritairement au niveau des axones et en petite quantité dans les dendrites et les noyaux neuronaux (Duquette, A. et al., 2020). La protéine Tau peut aussi être retrouvée en faible quantité dans des cellules non neuronales. Par exemple, l'ARN messenger (ARNm) de Tau ainsi que la protéine ont été détectés dans plusieurs tissus périphériques comme le cœur, les poumons, le pancréas ainsi que dans les fibroblastes (Gu, Y. et al., 1996; Ingelson, M. et al., 1996; Vanier, M.T. et al., 1998). De plus, en condition pathologique, la protéine Tau peut être exprimée dans les cellules gliales (Chin, S.S. et al., 1996).

1.2.1 Gène

La protéine Tau humaine est codée par le gène *MAPT* localisé sur le bras long du chromosome 17, à la position 17q21 (Neve, R.L et al., 1986). Le transcrit primaire de Tau contient 16 exons (**Figure 4**). Les exons 0 et 14 sont retrouvés dans l'ARNm, mais ne sont pas traduits dans la protéine (Andreadis, A. et al., 1992; Goedert, M. et al., 1989; Goedert, M. et al., 1989). Pour les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13, ceux-ci sont des exons constitutifs. Les exons 4A, 6 et 8 sont transcrits uniquement pour le système nerveux périphérique. Pour ce qui est des exons 2, 3 et 10, ceux-ci sont impliqués dans les épissages alternatifs produisant six isoformes différentes (Andreadis, A. et al., 1992; Goedert, M. et al., 1989; Goedert, M. et al., 1989).

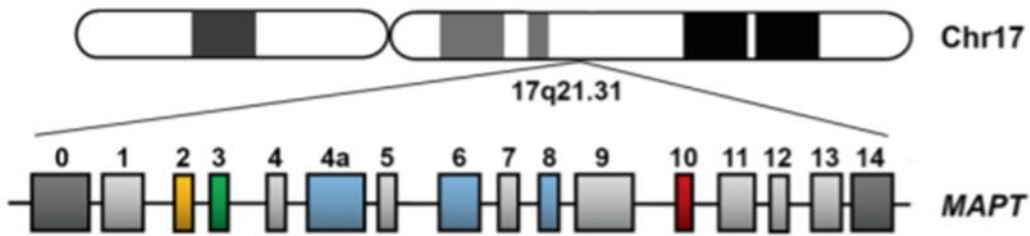


Figure 4 : Schéma du gène humain *MAPT* avec ces 16 exons situés sur le chromosome 17q21.31. (Didonna, A., 2020)

1.2.2 Isoformes

Les isoformes retrouvées dans le cerveau humain ont des tailles qui varient entre 352 à 441 acides aminés (a.a). Chaque isoforme possède une région riche en proline (PRR), mais diffère selon le nombre d'insert au niveau du N-terminal: 0, 1 ou 2, et du nombre de domaines de liaison aux microtubules (MBRs) au niveau du C-terminal: 3 ou 4, formant ainsi les isoformes 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R et 2N4R (**Figure 5**). Les isoformes de Tau sont exprimées de manière différentielle au cours du développement leur permettant d'avoir des rôles physiologiques distincts. Par exemple, on ne retrouve que l'isoforme 0N3R dans le cerveau fœtal tandis que dans le cerveau adulte on retrouve les 6 isoformes. De plus, dans le cortex cérébral humain sain, on retrouve une quantité égale des isoformes 3R et 4R (Goedert, M. et al., 1989). Cependant, une étude a montré que les isoformes ayant les inserts 0N, 1N et 2N sont retrouvées en plus grande quantité dans le système nerveux central, soit à 37%, 54% et 9% respectivement.

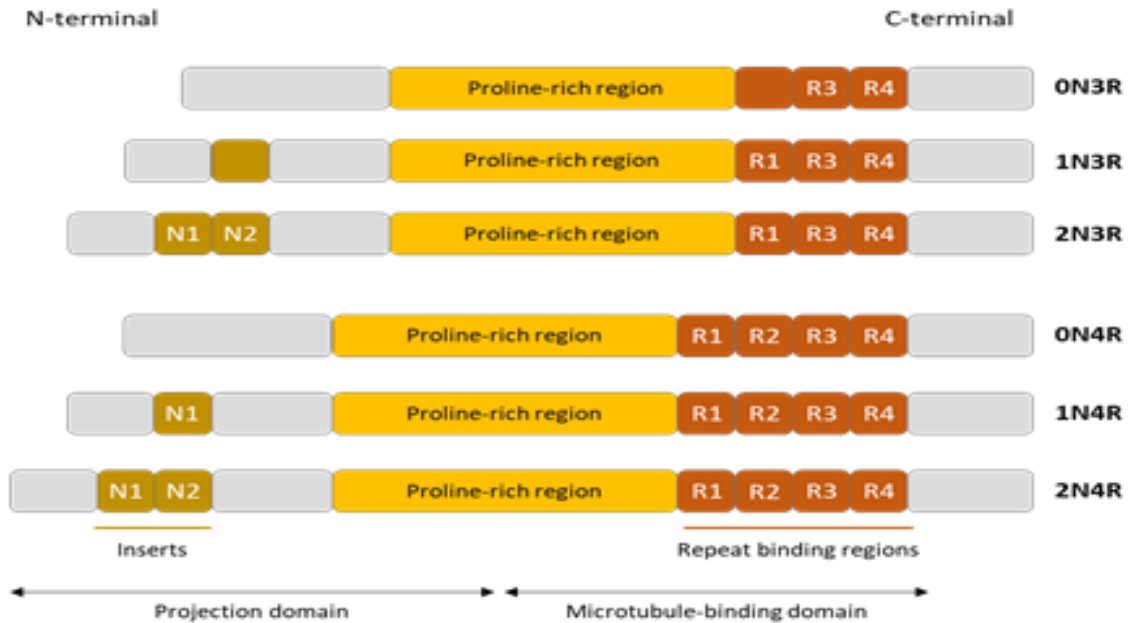


Figure 5. Isoformes de la protéine Tau dans le cerveau humain. (Duquette, A. et al., 2020)

1.2.3 Structure de Tau et fonctions de chaque domaine

Des études biophysiques ont montré que la composition globale des a.a de la protéine Tau la rend extrêmement hydrophile lui conférant une conformation native dépliée (Mukrasch, M.D. et al., 2009; Avila, J. et al., 2016; Jeganathan, S. et al., 2006). La chaîne polypeptidique a donc une haute flexibilité et mobilité lui permettant d'effectuer ses fonctions physiologiques. Chaque domaine possède des fonctions physiologiques différentes. Le domaine N-terminal, possédant les inserts, ne se lie pas directement aux microtubules (MTs), mais s'associe plutôt à la membrane cellulaire permettant ainsi de réguler la dynamique des MTs en influençant l'attachement et/ou l'espacement entre les MTs et d'autres composants cellulaires (Morris, M. et al., 2012). Il a aussi été démontré

que ce domaine est important dans la cascade de signalisation inhibant le transport axonal dans les neurones. Le PRR joue un rôle important dans la stabilisation des MTs, la liaison à l'actine et possède aussi plusieurs sites de reconnaissance pour le domaine Src homologue-3 (SH3) présent dans plusieurs protéines (Morris, M. et al., 2012). De plus, une étude récente suggère que cette région joue un rôle important dans la polymérisation des MTs puisqu'elle se lie plus fortement à la tubuline (McKibben, K.M., et Rhoades, E, 2019). La liaison de Tau aux MTs est principalement médiée par les domaines 1R à 4R. Ces domaines sont constitués d'une répétition de 18 a.a hautement conservés. Il a été montré que les isoformes 4R favorisent un meilleur assemblage des MTs que l'isoforme fœtale 3R (Buée, L. et al., 2000; Lee, G. et al., 1989). De plus, des études ont montré que plusieurs protéines peuvent aussi se lier aux MBRs, telles que la PSEN1, l'APOE, la F-actine et l'alpha-synucléine. Pour finir, le domaine C-terminal peut influencer les autres domaines ainsi que leur interaction avec d'autres protéines. Le domaine C-terminal peut se replier sur les MBRs et le domaine N-terminal se repli à son tour sur le C-terminal ce qui produit une conformation secondaire en forme de « trombone » (Jeganathan, S. et al., 2006; Avila, J. et al., 2016; Mukrasch, M.D. et al., 2009). Cette conformation cause le détachement de Tau aux microtubules causant par le fait même leurs déstabilisations.

1.2.4 Fonctions physiologiques

Dans le cerveau humain, la protéine Tau est principalement retrouvée dans les neurones et en faible quantité dans les oligodendrocytes ainsi que les astrocytes (Müller, R. et al., 1997; Kovacs, G.G., 2020). Dans les neurones, Tau est majoritairement retrouvée au niveau des axones, mais peut être retrouvée en petite quantité dans le compartiment somato-dendritique. Au niveau de l'axone, Tau joue un rôle important dans la stabilisation des MTs ce qui est essentiel pour plusieurs fonctions dans le maintien de la morphologie neuronale, telles que le transport intracellulaire des organites, la transduction du signal et l'organisation du cytosquelette (Barbier, P. et al., 2019). Le

déplacement de Tau le long des MTs, par diffusion ou transporté par des protéines motrices, comme par la famille des kinésines (Hinrichs, M.H. et al., 2012; Konzack, S. et al., 2007; Utton, M.A. et al., 2005), permet le bon fonctionnement des MTs ainsi qu'une bonne régulation du transport axonal. Le déplacement de Tau cytosolique vers les axones permet aussi de contrôler le niveau de Tau dans les axones. Les MTs sont des composants essentiels du cytosquelette et sont formés de dimères de tubuline constitués d'une sous-unité α -tubuline et d'une sous-unité β -tubuline produisant un protofilament. La stabilisation des microtubules par Tau peut déclencher des modifications post-traductionnelles (PTMs) au niveau de la tubuline, dont principalement l'acétylation de l' α -tubuline (Szyk, A., et al., 2014). Une étude a montré que la surexpression de Tau réduit le temps de croissance de MTs. Le taux de croissance des MTs affecte directement la dynamique des MTs. À long terme, la stabilisation des MTs par Tau serait donc néfaste pour les neurones (Bunker, J.M. et al., 2004).

Des études ont montré la présence d'une faible quantité de Tau dans les dendrites et les épines dendritiques en condition physiologique. Il a été démontré, avec des neurones d'hippocampes de rat, que Tau est importante dans la régulation de la plasticité synaptique (Chen, Q. et al., 2012). La présence de Tau contribue à la production d'une bonne densité post-synaptique, des épines dendritiques ainsi que la bonne sensibilité des jeunes neurones granuleux aux modulateurs de la neurogenèse (Pallas-Bazarra, N. et al., 2016).

En condition physiologique, la protéine Tau joue aussi un rôle important au niveau des membranes neuronales. Le domaine N-terminal de Tau a été reporté comme étant un médiateur important dans l'interaction de Tau avec la membrane plasmique, médiée par l'Annexine A2 (Gauthier-Kemper, A. et al., 2011). De plus, le domaine C-terminal de Tau contribue *via* la tubuline à réguler ses liaisons à la membrane plasmique (Kadavath, H. et al., 2018). La liaison de Tau avec la membrane plasmique joue donc un rôle dans la

régulation du cytosquelette. De plus, l'association de Tau avec les membranes favorisent le développement des neurites (Gauthier-Kemper, A. et al., 2011).

Pour finir, plusieurs études ont montré la présence de Tau dans le noyau des neurones. La protéine Tau interagit avec l'ARN et l'ADN pour les protéger de dommages causés par le stress oxydatif. Elle joue aussi un rôle dans le maintien de la stabilité génomique ainsi que dans le maintien de la structure de la chromatine (Sultan, A. et al., 2011; Sjoberg, M.K et al., 2006; Rossi, G. et al., 2008).

1.2.5 L'interactome de Tau

Physiologique

L'interaction de Tau avec les microtubules est la plus étudiée. Cependant due à sa conformation dépliée, Tau peut interagir avec beaucoup de protéines (**Figure 6**). Les interactions peuvent se faire au niveau du domaine N-terminal, de la région riche en proline (PRR) et de la région MBRs (Trushina, N.I., 2019). L'interaction de la Tau avec des kinases, comme Cdk5, Ck1, AMPK, MARKs et PKA, est aussi très connue puisque ces kinases jouent un rôle important dans la phosphorylation de Tau. La phosphorylation normale de Tau est importante dans la modulation de diverses interactions intracellulaires. Une analyse GO-Term a identifié plusieurs protéines interagissant avec la protéine Tau physiologique (Trushina, N.I. et al., 2019). Celles-ci font principalement partie de l'organisation membranaire, de la régulation de l'apoptose et de la mort cellulaire ainsi que la transduction du signal et la régulation des processus et réponses intracellulaires. Cependant, celles-ci peuvent se lier à plus d'un domaine de Tau. Par exemple, les protéines de l'organisation membranaire ainsi que de la régulation de l'apoptose et de la mort cellulaire se lient aux domaines N-terminal et PRR tandis que les

protéines de transduction du signal ainsi que de la régulation des processus et réponses intracellulaires peuvent se lier au N-terminal, PRR et MBRs. Cependant l'interactome du domaine MBR semble exclusif aux protéines de la transduction du signal ainsi que de la régulation des processus et réponses intracellulaires.

Protein	Gene name (<i>H. sapiens</i>)	Selected references	Potential physiological function
N-terminal projection region (NTR)			
End-binding proteins	MAPRE1, MAPRE3	Sayas et al. (2019)	regulation of microtubule dynamics
Annexin A2	ANXA2	Gauthier-Kemper et al. (2018)	contribution to tau's axonal localization
Annexin A6	ANXA6	Gauthier-Kemper et al. (2018)	contribution to tau's axonal localization
Annexin A5	ANXA5	Stefanoska et al. (2018)	
14-3-3 β , 14-3-3 δ	YWHAH, YWHAH	Stefanoska et al. (2018)	modulation of cell signaling
Synapsin-1	SYN1	Stefanoska et al. (2018)	modulation of transmitter release
Synaptotagmin-1	SYT1	Stefanoska et al. (2018)	modulation of transmitter release
14-3-3 ϵ , γ , ζ , and σ	YWHAH, YWHAG, YWHAZ, SFN	Tugaeva et al. (2017)	modulation of cell signaling
Synaptic vesicles	VAMP2	Zhou et al. (2017)	modulation of transmitter release
Prion protein (PrP)	PRNP	Wang et al. (2008)	
Dynactin complex	DCTN1	Magnani et al. (2007)	modulation of organelle transport
Heparin	NA	Sibille et al. (2006)	
Glycogen synthase kinase-3 β	GSK3B	Sun et al. (2002)	modulation of axonal phosphorylation
Membrane cortex	ACTB	Brandt et al. (1995) and Maas et al. (2000)	contribution to tau's axonal localization
Proline-rich region (PRR)			
Bridging integrator-1 (BIN1)	BIN1	Malki et al. (2017) and Sottejeau et al. (2015)	
14-3-3 σ	SFN	Joo et al. (2015)	modulation of cell signaling
DNA	NA	Qi et al. (2015)	transcriptional regulation
Protein phosphatase PP2A/B α	PPP2R2A	Sontag et al. (2012)	modulation of axonal phosphorylation
Src-family non-receptor tyrosine kinases fyn	FYN	Lee et al. (1998) and Usardi et al. (2011)	modulation of cell signaling
Heparin	NA	Sibille et al. (2006)	
Peptidyl prolyl cis/trans-isomerase Pin1	PIN1	Smat et al. (2004)	
Src-family non-receptor tyrosine kinases src	SRC	Lee et al. (1998)	modulation of cell signaling
Microtubule-binding region (MBR)			
Heat shock cognate 71 kDa protein (Hsc70)	HSPA8	Taylor et al. (2018) and Sarkar et al. (2008)	
Small heat shock protein HspB1/heat shock protein 27 (Hsp27)	HSPB1	Frellich et al. (2018)	
End-binding proteins (EBs)	MAPRE1, MAPRE3	Ramirez-Rios et al. (2016)	regulation of microtubule dynamics
14-3-3 σ	SFN	Joo et al. (2015)	modulation of cell signaling
DNA	NA	Qi et al. (2015)	transcriptional regulation
Amyloid β (A β)	APP	Pérez et al. (2004) and Manczak and Reddy (2013)	
Protein disulfide isomerase (PDI)	P4HB	Xu et al. (2013)	
Protein phosphatase PP2A/B α	PPP2CA	Sontag et al. (2012)	modulation of axonal phosphorylation
Heparin	NA	Zhu et al. (2010) and Sibille et al. (2006)	
Histone deacetylase 6	HDAC6	Ding et al. (2008)	transcriptional regulation
Prion protein (PrP)	PRNP	Wang et al. (2008)	
Phosphatase 2A (PP2A) isoform A β alphaC	PPP2CA	Sontag et al. (1999) and Eidenmuller et al. (2000)	modulation of axonal phosphorylation
Tau (tau-tau interaction)	MAPT	Pérez et al. (1996)	
Actin filaments	ACTB	Correas et al. (1990), Moraga et al. (1993) and Seiden and Pollard (1986)	regulation of cytoskeletal interactions
Microtubules	NA	Butner and Kirschner (1991), Lee et al. (1989) and Gustke et al. (1992)	regulation of microtubule dynamics
Calmodulin	CALM1	Padilla et al. (1990)	modulation of cell signaling
C-terminal region (CTR)			
Microtubules	NA	Kadavath et al. (2015)	regulation of microtubule dynamics
Heparin	NA	Sibille et al. (2006)	

Figure 6 : Partenaires de liaison de Tau dont les interactions ont été cartographiées sur les régions de la protéine Tau. Les partenaires de liaison sensibles à la Tau phosphorylée sont indiqués en rouge (Trushina, N.I., 2019).

Pathologique

Une étude protéomique récente a montré que plusieurs protéines interagissent avec la Tau phosphorylée et/ou les NFTs (Drummond, E. et al., 2020). Leur analyse par LC-MS a identifié 125 protéines interagissant avec la Tau phosphorylée (**Figure 7(A)**). La majorité des protéines interagissant avec la Tau phosphorylée sont des protéines spécifiques aux neurones. Cependant quelques protéines spécifiques aux astrocytes et des protéines spécifiques à la microglie, aux oligodendrocytes et à l'endothélium ont été identifiées dans l'interactome de Tau phosphorylée. Plusieurs protéines de liaison aux microtubules ont été retrouvées comme interactome de Tau phosphorylée, telles que la MAP1B, MAP2 et MAP4. De plus, une seule protéine tubulaire a été retrouvée dans l'interactome, soit TUBA8. L'analyse de l'interactome de Tau phosphorylée a montré que celui-ci était enrichi principalement de protéines impliquées dans le système ubiquitine-protéasome, soient plusieurs ubiquitines ainsi que plusieurs sous-unités protéiques du régulateur 19S. Des protéines ATPases vacuolaires et certains complexes SNARE, impliquées dans la maturation des phagosomes, ont aussi été retrouvés dans l'interactome de Tau phosphorylée. De plus, cette analyse a montré que plusieurs kinases et phosphatases interagissaient avec la Tau phosphorylée. Pour ce qui est de l'analyse par LC-MS des NFTs, celle-ci a identifié 542 protéines séquestrées dans les NFTs, dont 75 protéines font aussi partie de l'interactome de Tau phosphorylée (**Figure 7(B)**). Ils ont confirmé la présence de grandes quantités de Tau, d'Ubiquitine, d'APOE, de GAPDH, de CDK5 ainsi que des chaînes légères de neurofilament dans les NFTs. Cependant, ils ont identifié dans les NFTs plusieurs familles de protéines qui sont impliquées dans le dysfonctionnement mitochondrial, la maturation des phagosomes, la signalisation 14-3-3 et l'ubiquitinylation. Des protéines de liaison à l'ARN et des protéines de choc thermique 70 et 90 (Hsp70 et Hsp90) ont aussi été retrouvées en grande majorité dans les NFTs. Cette étude protéomique montre l'importance de l'interaction et de la séquestration de protéines par la protéine Tau phosphorylée et les NFTs dans le dysfonctionnement de plusieurs voies métaboliques retrouvées dans la MA, dont principalement la dégradation par l'ubiquitine-protéasome et l'autophagie.

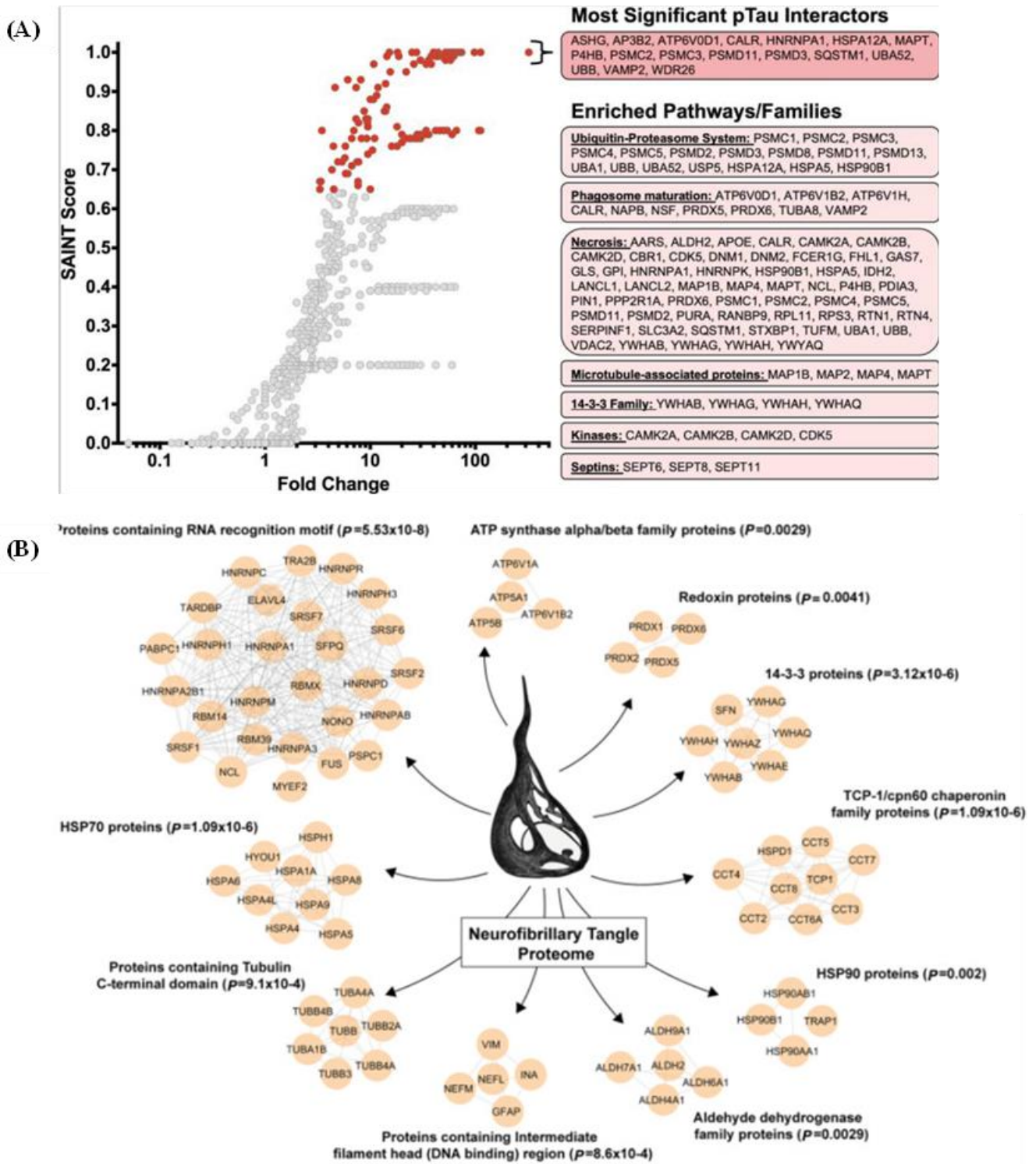


Figure 7 : Proteomique de Tau phosphorylée des NFTs. (A) Protéines interagissant avec Tau phosphorylée. **(B)** Familles de protéines retrouvées séquestrées dans les NFTs. (Drummond, E. et al.,2020)

1.3 Tauopathies

Les démences et les autres maladies avec un trouble du mouvement caractérisées principalement par une accumulation intracellulaire anormale de Tau formant des filaments neurofibrillaires sont appelées tauopathies. L'accumulation est majoritairement produite par l'augmentation anormale de Tau phosphorylée, mais peut aussi être produite due à une augmentation du niveau de Tau, un clivage anormal de Tau ainsi que par des mutations dans le gène *MAPT*. Dans ce groupe de maladies on retrouve la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la démence cortico-basale (CBD), la maladie de Pick, la démence lobaire frontotemporale-Tau (FTLD-Tau) et la MA (Horowitz, P.M et al., 2004; Arai, T. et al., 2004; Igaz, L.M. et al., 2009; Irwin, D.J. et al., 2013; Min, S.W. et al., 2015).

1.3.1 Modifications post-traductionnelles

La protéine Tau peut subir plusieurs PTMs, telles que la phosphorylation, l'acétylation, le clivage, la méthylation, l'oxydation, la glycosylation, l'ubiquitination, la nitration, la polyamination et la sumoylation (**Figure 8**).

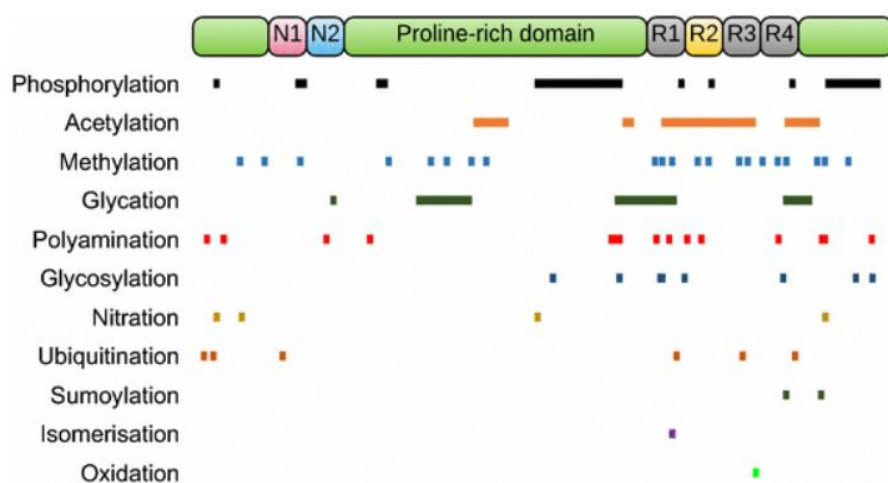


Figure 8 : Les différentes modifications post-traductionnelles et leurs sites approximatifs sur la plus grande isoforme de Tau (2N4R, 441 a.a.). (Guo, T. et al., 2017)

Phosphorylation

La protéine Tau possède 85 sites de phosphorylation majoritairement retrouvés dans le domaine riche en proline, le domaine de liaison aux microtubules et le domaine C-terminal (Noble, W. et al., 2013; Trushina, N.I., 2019). La phosphorylation joue un rôle important dans la régulation des fonctions physiologiques de Tau. Elle régule plus du tiers de ces interactions avec les autres protéines (Noble, W. et al., 2013; Hanger, D.P. et al., 2009). Cette PTM est régulée par plusieurs kinases, dont GSK-3 β , CDK5, MARKs, PKA, CaMKII et Fyn ainsi que des phosphatases, dont PP1, PP2A et PP5 (Ferrer, I. et al., 2005; Ji, C. et al., 2019; Martin, L. et al., 2011). Plus de 40 sites de phosphorylation ont été identifiés comme cible de la kinase GSK-3 β (Hanger, D.P. et al., 2009). Cette phosphorylation est importante dans l'ubiquitination de Tau, puisqu'elle favorise sa liaison avec Hsc70 et le recrutement de la ligase E3 CHIP (Shimura, H. et al., 2004). Le site T231, situé dans le PRR, est un des premiers sites phosphorylés par GSK-3 β (Cho, J.H. et Johnson, G.V., 2004). Des études ont montré que la phosphorylation en C-terminal favorise l'auto-agrégation de Tau (Ercan-Herbst, E. et al., 2019; Gong, C.X. et Iqbal, K., 2008). Dans la MA, la progression de la neurodégénérescence corrèle avec la suractivation de GSK-3 β (Pei, J.J. et al., 1997). Cette kinase ainsi que les autres mentionnées plus haut ont été retrouvées séquestrées dans les NFTs (Hanger, D.P. et al., 1992). De plus, il a été montré que l'interaction de Tau avec la kinase Fyn joue un rôle dans l'excitotoxicité induite par A β (Seward, M.E. et al., 2013). Pour ce qui est des phosphatases, celles-ci déphosphorylent la protéine Tau permettant de réguler le niveau de phosphorylation. La phosphatase la plus active dans le cerveau est PP2A (Gong, C.X. et al., 2000). Cependant dans la MA, l'activité des phosphatases est nettement réduite (Liu, F. et al., 2005). La baisse de l'activité des phosphatases ainsi que la suractivation des kinases sont responsables de l'hyperphosphorylation de Tau. L'hyperphosphorylation de Tau réduit son affinité pour les microtubules ce qui cause son détachement et provoque une déstabilisation du cytosquelette du neurone. Une fois détachée, la Tau hyperphosphorylée se délocalise et s'auto-agrège dans le compartiment somato-dendritique. De plus, les agrégats de Tau hyperphosphorylée interagissent avec beaucoup

de protéines causant leur séquestration ce qui produit des dysfonctionnements des voies de signalisation cellulaire.

Clivage protéolytique

Le clivage protéolytique de Tau est une PTM retrouvée dans plusieurs maladies neurodégénératives, dont la MA, la PSP, la CBD et la FTLD (Horowitz, P.M et al., 2004; Arai, T. et al., 2004; Igaz, L.M. et al., 2009). La protéine Tau est sensible au clivage protéolytique dû à sa conformation native dépliée. La protéine Tau est majoritairement clivée par les caspases et la calpaïne ainsi que d'autres protéases, comme la thrombine, la cathepsine et la protéase sérine HTRA1 (**Figure 9**) (Johnson, G.V. et al., 1989; Gamblin, T.C. et al., 2003; Arai, T. et al., 2005; Bednarski, E. et al., 1996). Les caspases et la calpaïne sont les deux types de protéases les plus importantes dans le clivage de Tau. La caspase-3 joue un rôle important dans la cascade apoptotique et clive majoritairement la Tau au site D421 en C-terminal obtenant ainsi le fragment Tau-C3 (Chung, C.W. et al., 2001; Gamblin, T.C. et al., 2003). Des études ont montré que Tau-C3 est plus facilement agrégée que la protéine Tau pleine longueur. Dans la MA, la quantité de Tau-C3 est augmentée dans les neurones et co-localise avec les NFTs (Gamblin, T.C et al., 2003; Cotman, C.W. et al., 2010). Une forte corrélation entre la formation des NFTs dans les neurones et l'augmentation de l'activité de la caspase-3 a été démontrée *in vivo* (de Calignon, A. et al., 2010; Su, J.H. et al., 2001). De plus, la présence de Tau clivée en C-terminal est fortement corrélée avec les lésions neuropathologiques et les troubles cognitifs. La perte des fonctions cognitives corrèle avec l'augmentation de Tau-C3 et sa co-localisation aux NFTs (Su, J.H. et al., 2001; Basurto-Islas, G. et al., 2008).

La calpaïne a aussi été démontrée comme une protéase impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives. La protéine Tau possède plusieurs sites de clivage par la calpaïne pouvant former ainsi différents fragments. Dans la MA, la forme active calpaïne-2 a été retrouvée dans un grand nombre des NFTs (50-75%) (Adamec, E. et al., 2002).

L'augmentation de la forme active serait principalement causée par l'augmentation du calcium intracellulaire qui est une caractéristique commune des neuropathologies. Des analyses effectuées sur des échantillons de cerveaux MA ont montré une augmentation du niveau des fragments de 17 kDa, 24 kDa et 35 kDa qui sont obtenus par le clivage de la calpaïne (Grag, S. et al., 2011).

Des études récentes ont aussi montré l'importance de l'enzyme asparagine endopeptidase (AEP) dans le clivage de Tau et de l'A β dans la MA (Zhang, Z. et al., 2015; Mi, X. et al., 2022). Cette enzyme clive Tau en N255 et N368 supprimant ainsi complètement le MBRs ce qui produit son détachement des MTs et son auto-agrégation (Zhang, Z. et al., 2015). Une étude a montré dans des souris transgéniques que le clivage de Tau en N368 par l'AEP corrèle avec l'âge et que l'activité de l'AEP était plus élevée que dans les souris témoins. De plus, ils ont montré un fort niveau du fragment N368 clivé par l'AEP dans les cerveaux humains MA ainsi qu'une co-localisation de ce fragment avec les NFTs et la Tau phosphorylée (Zhang, Z. et al., 2015).

Pour ce qui est de la Tau clivée en N-terminal, celle-ci a été démontrée comme réducteur de l'interaction Tau-Tau (Gu, J. et al., 2020; Abraha, A. et al., 2000; Gamblin, T.C. et al., 2003). De plus, la phosphorylation de Tau sur certains sites dépend aussi de son clivage. Le clivage du domaine N-terminal ou du C-terminal joue un rôle important dans l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau (Gu. J. et al., 2020). Dans la MA, plusieurs fragments obtenus par le clivage protéolytique ont été retrouvés, dont les fragments 17 kDa, 20 kDa, 33 kDa et 35 kDa (Canu, N. et al., 1998; Sokolow, S. et al., 2015). Ces fragments peuvent induire l'agrégation de Tau, mais peuvent aussi activer la cascade de mort cellulaire.

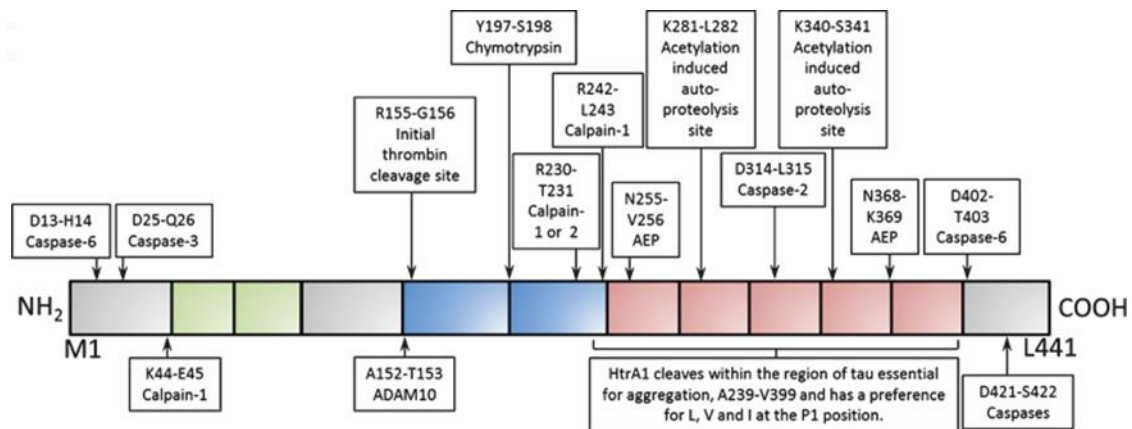


Figure 9 : Clivage protéolytique et leurs sites approximatifs sur la plus grande isoforme de Tau (2N4R, 441 a.a.). (Quinn, J.P. et al., 2018)

Acétylation

L'acétylation est une autre PTM importante dans la régulation de Tau physiologique. L'auto-acétylation permet de produire une meilleure fragmentation de Tau et de la dégrader *via* l'autophagie (Cohen, T.J. et al., 2016). En plus d'avoir une fonction inhibitrice directe sur la fonction de Tau, l'acétylation, telles qu'aux sites L259, L290, L321 et L353 joue aussi un rôle dans la régulation de la dynamique des microtubules en prévenant la phosphorylation de certains sites au niveau du MBRs (Cohen, T.J. et al., 2016; Cook, C. et al., 2014). Cependant, l'acétylation contribue aussi à la production de Tau pathologique. L'acétylation de Tau à la L174 et L274 a été détectée dans les cerveaux post-mortem de personnes atteintes de la MA, de la FTLD-Tau et de la PSP (Irwin, D.J. et al., 2013; Min, S.W. et al., 2015). Pour finir, des études ont montré que l'acétylation à certains sites de Tau inhibe sa dégradation par l'ubiquitine-protéasome (Yang, X.J. et al., 2008).

Glycosylation et Glycation

La glycosylation et la glycation jouent aussi un rôle important dans l'agrégation de Tau (Gendron, T.F. et Petrucelli, L. 2009). Ces deux PTMs participent à la formation de ponts disulfures ce qui favorise l'agrégation (Kuhla, B. et al., 2007). Pour la glycosylation, celle-ci est caractérisée par l'ajout d'oligosaccharides aux chaînes latérales d'une protéine. La glycosylation est classée en deux catégories, la N-glycosylation et la O-glycosylation. Des études ont montré que la N-glycosylation favorisait la formation des filaments hélicoïdaux appariés (PHFs) tandis que la O-glycosylation ralentit le processus d'agrégation *in vitro* (Wang, J.Z. et al., 2008; Yu, C.H. et al., 2008). Une diminution de la O-glycosylation a été observée dans des cerveaux MA.

Pour ce qui est de la glycation, celle-ci est caractérisée par l'établissement d'une liaison covalente entre un glucide et une protéine. Cette PTM a été rapportée exclusivement dans la MA au niveau des PHFs (Wang, J.Z. et Liu, F. 2008). Son emprisonnement dans les PHFs suggère que cette PTM favorise aussi l'agrégation de Tau.

Ubiquitination

L'ubiquitination est une des PTMs la plus courante dans les cellules de mammifères. L'ubiquitine est une protéine hautement conservée de 76 acides aminés et permet de réguler l'activité, la stabilité et la localisation des protéines (Behrends, C. et al., 2011). La majorité des sites d'ubiquitination de Tau se trouve sur les mêmes acides aminés que les sites d'acétylation (Ikeda, F. et Dikic, I. 2008). Cela suggère que la dégradation dépendante de l'ubiquitination serait régulée par l'acétylation. Les sites

d'ubiquitination possèdent des fonctions différentes, soit dans la prolifération ou dans la réparation des dommages à l'ADN (Behrends, C. et al., 2011; Ikeda, F. et Dikic, I. 2008; Nathan, J.A. et al., 2013). L'ubiquitination est aussi très importante dans la dégradation par le protéasome (UPS). Dans la MA, une accumulation de l'ubiquitine a été retrouvée dans les NFTs ainsi que dans les plaques A β ce qui cause une inhibition de l'UPS (Oddo, S. 2008).

Autres PTMs

Plusieurs autres PTMs peuvent se produire, telles que la nitration, la SUMOylation, la méthylation et l'oxydation. Pour la nitration de Tau, celle-ci s'effectue lorsqu'il y a un important niveau de dommages oxydatifs dans le cerveau. Cette PTM inhibe la stabilisation des microtubules et favorise l'agrégation de Tau (Reyes, J.F. et al., 2012). Dans la MA, une étude a montré un niveau élevé de Tau nitrée dans les régions de l'hippocampe et néocortical ainsi que dans le liquide cérébro-spinal. Pour la SUMOylation, celle-ci joue un rôle important dans l'expression génique, la stabilité génomique, la réponse aux dommages à l'ADN, aux trafics de protéines ainsi que dans la régulation du cycle cellulaire (Hickey, C.M. et al., 2012; Müller, S. et al., 2004). Cette PTM est possible seulement lorsque Tau se détache des microtubules (Dorval, V., et al., 2006). Les impacts de cette PTM sur Tau ne sont pas tout à fait compris. Cependant, des études suggèrent que la SUMOylation de Tau régulerait la dégradation par l'inhibition de la voie du protéasome et de l'autophagie et la dégradation par l'autophagie (Dorval, V., et al., 2006). La protéine Tau possède aussi plusieurs sites de méthylation. Il a été démontré que le niveau de Tau méthylée augmente avec le vieillissement et qu'elle augmente aussi avec la progression de la MA (Huseby, C.J. et al., 2019; Kontaxi, C. et al., 2017). De plus, une grande partie des sites de méthylation se trouve au niveau du MBRs suggérant ainsi que la méthylation de ces sites inhibe l'affinité aux microtubules (Kontaxi, C. et al., 2017). Pour finir, comme toutes les autres protéines, Tau est sensible aux changements d'oxydo-réduction. L'effet de l'oxydation sur les fonctions de Tau n'est pas encore connu.

Cependant une étude *in vitro* a montré que l'oxydation de Tau semble favoriser l'agrégation de Tau en PHFs (Schweers, O. et al., 1995).

1.3.2 Agrégation

La protéine Tau est hyperphosphorylée ce qui cause son détachement des microtubules et son auto-agrégation dans le compartiment somatodendritique (**Figure 10(A)**). Ces agrégats ne pouvant pas être dégradés par le protéasome et/ou l'autophagie finissent par s'accumuler et former des NFTs. L'accumulation de Tau corrèle avec l'apparition des troubles cognitifs dans la MA et suit les six stades de Braak. Stade I et II) les NFTs sont premièrement détectées dans le cortex transentorhinal et s'étendent au niveau de l'entorhinal et de l'hippocampe. Stade III et IV) les NFTs se propagent aux zones associatives néocorticales d'ordre supérieur. Stage V et VI) les NFTs se répandent jusqu'aux couches primaires et secondaires du néocortex (**Figure 10(B)**) (Braak, H. et Braak, E. 1991). De plus, la composition des agrégats de Tau diffère d'une tauopathie à l'autre. Par exemple, dans la PSP et la CBD, les agrégats sont composés uniquement des isoformes 4R tandis que dans la maladie de Pick et la FTLD-Tau ils sont constitués uniquement des isoformes 3R. Pour ce qui est de la MA, les agrégats sont formés d'un mélange d'isoformes 4R et 3R (Buée, L. et Delacourte, A., 1999; Ferrer, I. et al., 2014, Munoz, D.G., 2003; Delacourte, A. et al., 1998). De plus, les exons 2, 3 et 10 jouent aussi un rôle dans l'agrégation de Tau. La séquence codée par l'exon 2 favorise l'agrégation de Tau comparativement aux séquences codées par les exons 3 et 10 qui ont un effet inhibiteur sur l'agrégation de Tau (Zhong, Q. et al., 2012). En plus de l'hyperphosphorylation et des inserts au niveau du N-terminal, l'agrégation de Tau est aussi affectée par d'autres PTMs comme le clivage protéolytique, la glycosylation, la glycation et la nitration ainsi que par la présence de mutation dans le gène *MAPT* (Lewis, J. et al., 2000).

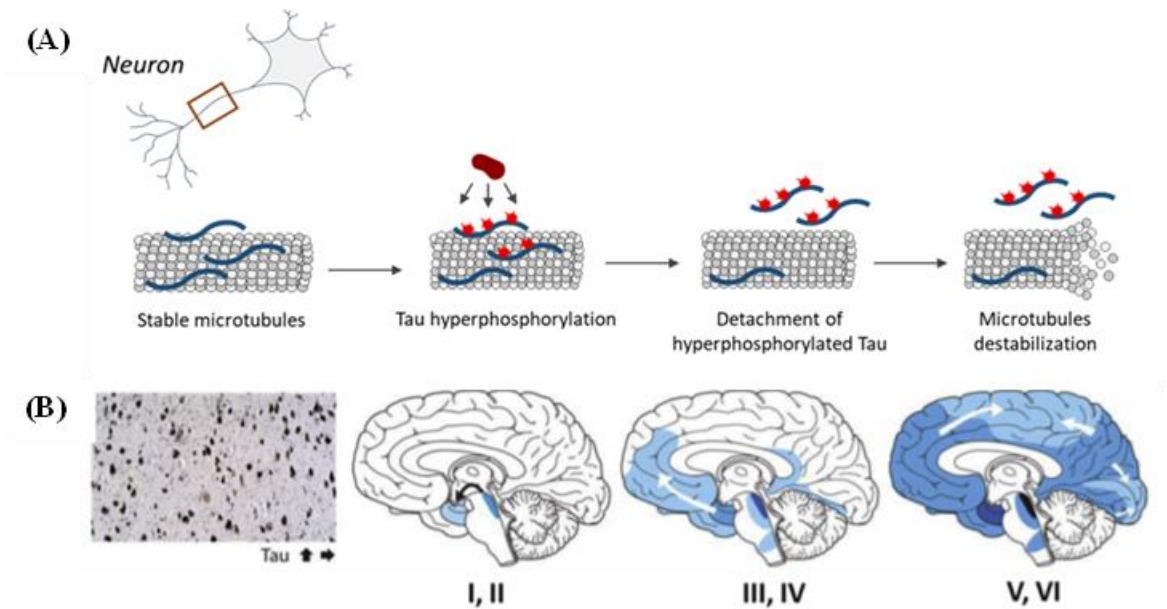


Figure 10 : Mécanisme d'agrégation de Tau et son accumulation dans la MA. (A) Détachement de Tau des microtubules dû à son hyperphosphorylation. **(B)** Accumulation des enchevêtrements neurofibrillaires dans le cerveau de patient MA. (Modifié de Duquette, A. et al., 2020; Jouanne, M. et al., 2017)

Oligomères

Les oligomères de Tau sont principalement composés de monomères et/ou dimères de Tau hyperphosphorylées, mais peut aussi contenir des Tau clivées (Zilka, N. et al., 2006). Des oligomères avec la Tau pleine longueur ont aussi été observés (Sahara, N. et al., 2007). L'assemblage des monomères et/ou dimères forme une structure de 20nm en feuillet- β contenant les MBRs 3 et 4 (Sugino, E. et al., 2009). Des études sur des prélèvements de cerveaux MA ont aussi révélé la présence d'oligomères granulaires qui ont une taille de 40nm (Maeda, S. et al., 2007). De plus les oligomères de Tau ont été retrouvés dans le noyau. Ceux-ci peuvent interagir avec le facteur de transcription p53 altérant ainsi plusieurs fonctions, tels que l'apoptose et la réparation des dommages à l'ADN (Kastan, M.B. et al., 1991). Les oligomères ont été détectés dans les premiers stades

de la MA au niveau des neurones, bien avant l'apparition des NFTs (Maeda, S. et al., 2006). Plusieurs études ont démontré que les oligomères Tau sont la forme la plus toxique pour les neurones (Lasagna-Reeves, C.A. et al., 2010; Fox, L.M. et al., 2011, Maeda, S. et al., 2006; Nieznanska, H. et al., 2021).

Enchevêtrements neurofibrillaires

Les NFTs sont composés de deux types de fibrilles, soient les PHFs et filaments droits (SFs) (Kidd, M. et al., 1963; Kosik, K. et al., 1986; Kosik, K. et al., 1988). Dans la MA on retrouve majoritairement des PHFs (90%) (Falcon, B. et al., 2018). Cependant, les PHFs et les SFs partagent le même noyau structurel, formé des résidus V306-F378 correspondant aux MBRs R3 et R4 et 10 acides aminés supplémentaires (Anthony, W.P. et al., 2017). Une étude par microscopie électronique à coloration négative révèle que le noyau structurel est sous forme d'un double empilement hélicoïdal de sous-unité en forme de C. De plus, les domaines N-terminal et C-terminal se projettent de façon désordonnée loin du noyau structurel formant un « manteau flou ». Une étude effectuée sur des prélèvements de néocortex de sujets atteints de MA montre que les PHFs et les SFs sont principalement composés de Tau hyperphosphorylée et de Tau pleine longueur (Anthony, W.P. et al., 2017). Même si les NFTs ne sont pas la forme d'agrégat la plus toxique, la perte cognitive retrouvée dans la MA coïncide avec la propagation de ces derniers. Cependant des études ont montré, dans certains modèles animaux, la présence d'une neurodégénérescence en absence de NFTs (Feuillette, S. et al., 2010; Bonda, D.J. et al., 2011). Basé sur ces études, plusieurs chercheurs suggèrent que la formation de NFTs serait un mécanisme de protection contre le stress oxydatif (Li, H.L. et al., 2007).

1.3.3 Dysfonctionnement causé par la Tau pathologique

L'augmentation de la phosphorylation, de l'acétylation et du clivage de Tau, altèrent l'interaction de Tau avec les microtubules réduisant ainsi son habileté à stabiliser les microtubules et à maintenir un réseau cytosquelettique organisé (Goedert, M. et al., 2005; Tracy, T.E. et al., 2017). De plus, la Tau pathologique altère son interaction avec les protéines motrices, telle que la kinésine, ce qui cause un dysfonctionnement dans le transport axonal (Seitz, A. et al., 2002; Vershinin, M. et al., 2007). Sa migration vers le compartiment somatodendritique et les dendrites impacte aussi le transport axonal. L'augmentation de Tau dans les dendrites produit une mauvaise localisation de plusieurs cargos, comme les vésicules, les neurofilaments et les mitochondries qui sont normalement transportés entre les compartiments somatodendritiques et/ou axonaux et les terminaisons nerveuses (Zempel, H. et al., 2013; Zempel, H. et Mandelkow, E.M., 2015). Des études ont montré que la migration de Tau dans les dendrites serait une caractéristique neuropathologique retrouvée très tôt dans la MA et même avant l'agrégation de Tau (Braak, F. et al., 1994). Pour ce qui est de la protéine Tau pathologique migrée dans le compartiment somatodendritique, celle-ci s'accumule et s'auto-agrège en oligomères puis en NFTs.

L'augmentation anormale de Tau phosphorylée ainsi que la présence de Tau mutée et de stress oxydatif affectent plusieurs fonctions dans le noyau, dont l'altération de la transcription génique et la production d'aberration dans le chromosome 17 (Rossi, G. et al., 2013; Rossi, G. et al., 2008). La phosphorylation de Tau inhibe sa translocation au noyau l'empêchant d'interagir et de protéger l'ADN (Camero, S. et al., 2014; Lu, Y. et al., 2013; Qi, H. et al., 2015). De plus, l'absence de Tau dans le noyau produit un stress oxydatif causant des dommages chromosomiques et/ou à l'ADN (Frost, B. et al., 2014; Mondragon-Rodriguez, S. et al., 2013; Violet, M. et al., 2015). Des études ont aussi révélé la présence d'agrégats de Tau dans le noyau dans plusieurs tauopathies dont la MA (Fernandez-Nogales, M. et al., 2016). Une étude récente sur des cerveaux de souris et les

cellules HEK293 montre la présence de petits ARN nucléaires (ARNsn) et de petits ARN nucléolaires (ARNso) dans les agrégats de Tau dans le noyau (Lester, E. et al., 2021). Ceux-ci altèrent l'épissage pré-ARNm.

1.3.4 Dégradation de Tau

Comme toutes autres protéines, Tau est sujette à la dégradation par le protéasome et par l'autophagie. Cependant, plusieurs études ont montré que ses voies de dégradation sont altérées dans la MA (Chesser, A.S. et al., 2013).

Ubiquitination-protéasome

La dégradation par l'UPS se fait en deux étapes (**Figure 11**). La première étape consiste à l'ubiquitylation de la protéine, soit l'ajout d'une chaîne polyubiquitine *via* une cascade enzymatique impliquant 3 facteurs (E1, E2 et E3). La protéine poly-ubiquitynilée est présentée au protéasome 26S, formé par l'association d'un protéasome 20S au complexe régulateur 19S, qui procédera à la déubiquitynylation et à la dégradation de la protéine (Oddo, S. et al., 2008). Due à sa petite taille, sa conformation dépliée et à sa courte durée de vie, Tau est une protéine idéale pour la dégradation par l'UPS. Cependant dans la MA, des études ont montré une augmentation de l'ubiquitine dans les plaques A β et les NFTs ainsi qu'une diminution de l'activité du protéasome (Adrienne, S. et al., 2013). L'A β 42 a aussi été démontrée comme étant un inhibiteur endogène des fonctions du protéasome (Oh, S. et al., 2005). De plus, l'augmentation de protéines oxydées dans les cerveaux MA peut avoir un effet sur la diminution de l'activité du protéasome (Zhu, X. et al., 2007; Bence, N.F. et al., 2001). Il a été démontré que l'activité du protéasome diminue avec l'augmentation de la taille de la protéine. Une étude a montré que les agrégats de Tau co-précipitent avec le protéasome 20S (Keck, S. et al., 2003). Cela suggère que les

agrégats de Tau peuvent être associés aux protéasomes, mais ne peuvent pas être dégradés probablement en raison de leur taille plus élevée que la Tau monomérique.

Autophagie

La dégradation par l'autophagie est majoritairement utilisée sur les protéines et les agrégats de plus grosses tailles et ayant une durée de vie plus longue. On retrouve trois formes d'autophagie : 1) l'autophagie médiée par les chaperonnes 2) la microautophagie et 3) la macroautophagie (Zare-shahabadi, A. et al., 2015). Cependant, la macroautophagie est la forme d'autophagie la plus employée dans la dégradation des protéines (**Figure 11**). Celle-ci s'effectue en trois étapes. Tout d'abord, il y a la formation du phagophore avec une double membrane phospholipidique, ainsi que l'activation des protéines ATG. Le complexe ATG12 et la protéine LC-3 permettent d'allonger le phagophore pour former l'autophagosome qui vient emprisonner la protéine à dégrader. Pour finir, l'autophagosome fusionne avec le lysosome permettant de dégrader la protéine (Li, Q. et Sun, M. 2017; Zare-shahabadi, A. et al., 2015). De nombreuses études ont montré la présence de dysfonctionnement dans la macroautophagie dans la MA (Nixon, R.A. et al., 2006; Boland, B. et al., 2008; Rubinsztein, D.C. et al., 2005). L'analyse par microscopie électronique des tissus de cerveaux MA a révélé une accumulation des vacuoles autophagiques (AVs) dans les neurites. Cette accumulation corrèle aussi avec la présence de NFTs. De plus, certaines Tau mutées, lorsqu'elles sont clivées, peuvent être recrutées à la membrane lysosomale, mais ne pourront pas se transloquer correctement dans le lumen du lysosome. Ceci entraînera une accumulation de Tau clivée et formera alors des oligomères sur la membrane lysosomale. Ces agrégats causeront une perturbation au niveau de la membrane et libéreront les enzymes lysosomales causant ainsi une diminution de l'activité autophagique (Koga, H. et al., 2011; Li, Q. et Sun, M. 2017).

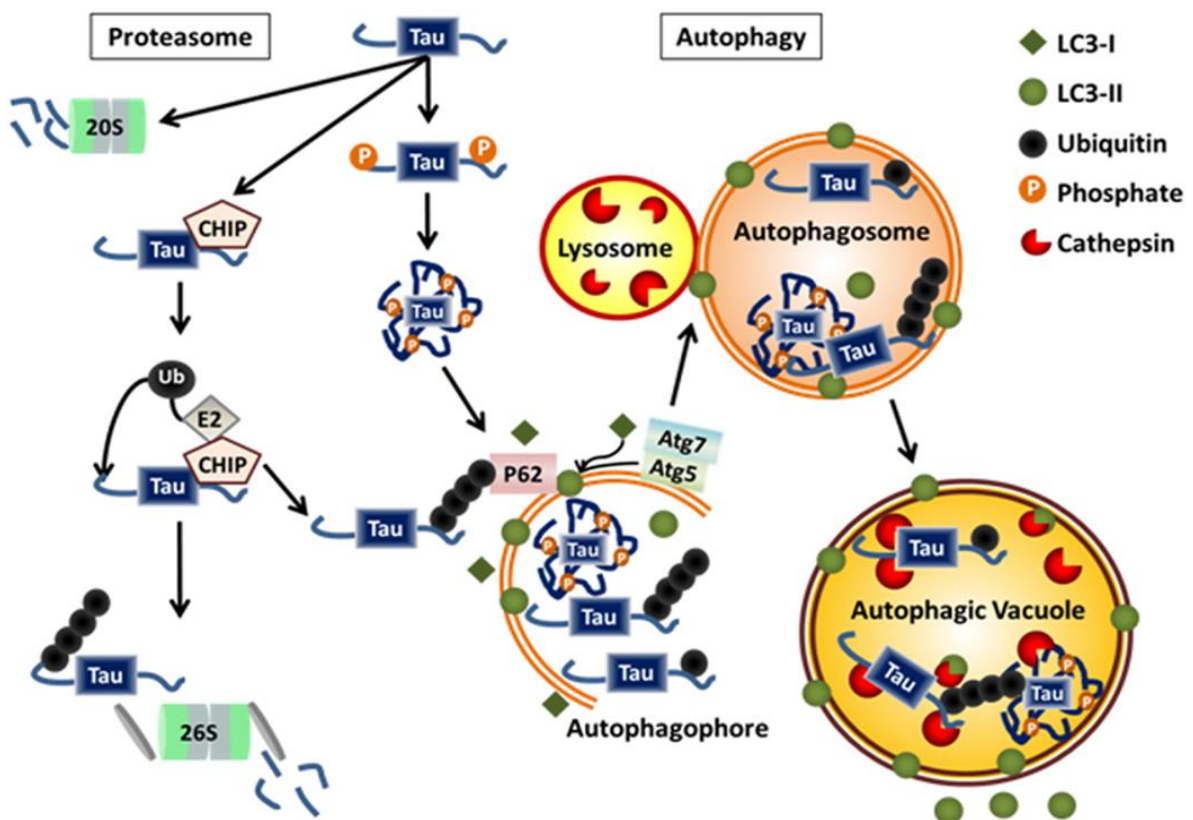


Figure 11 : Dégradation de Tau par le protéasome et par l'autophagie. (Adrienne, S. et al., 2013)

1.3.5 Mutations de Tau

Dans le gène *MAPT* humain, plus de 80 mutations ont été retrouvées dans les régions exoniques et introniques. Les mutations à proximité ou dans le domaine MDB ainsi que dans le domaine C-terminal réduisent l'affinité d'interaction de la protéine avec les microtubules, et la rend plus sensible à la phosphorylation ce qui favorise l'auto-agrégation. Les mutations retrouvées au niveau de l'intron et de l'exon 10 jouent un rôle important dans la maintenance du ratio 4R/3R. Le ratio de 1 :1 des isoformes est important pour le bon fonctionnement des rôles physiologiques. Lorsque ce ratio est déséquilibré, cela cause une accumulation dans le cytoplasme et favorise la formation de dépôts fibrillaires. Pour ce qui est des mutations dans le domaine N-terminal, celles-ci vont affecter l'assemblage des microtubules et favoriser aussi l'auto-agrégation (Rossi, G. et Tagliavini, F. 2015). Cependant, dans la MA, l'hyperphosphorylation de Tau ainsi que son agrégation ne sont pas causées par des mutations, puisque cette maladie est la seule tauopathie ne présentant aucune mutation sur le gène *MAPT*.

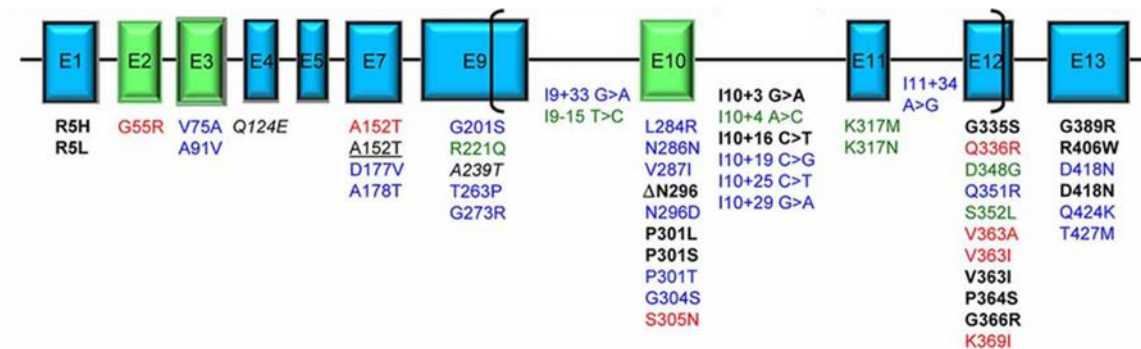


Figure 12 : Localisation des mutations sur la plus grande isoforme de Tau (2N4R, 441 a.a.). Les mutations en noir produisent des mécanismes pathogéniques inhabituels; celles en rouge affectent la polymérisation des MTs ou la formation de fibrilles; en bleu des mutations non caractérisées identifiées chez les patients atteints de FTLD ou de MA; en vert des mutations induisant des caractéristiques cliniques ou neuropathologiques atypiques; en italique des mutations associées à des facteurs de risque de tauopathie

lorsqu'elles sont associées à des mutations dans d'autres gènes; et la mutation soulignée est reliée à des facteurs de risque de tauopathie FTLD ou MA. (Rossi, G. et Tagliavini, F. 2015)

1.4 Modèles animaux et cellulaires pour l'étude de la MA

Plusieurs modèles animaux et cellulaires ont été développés pour l'étude de la MA. Cependant, il est très important de sélectionner le bon modèle selon l'étude, car chacun des modèles possède des caractéristiques pathologiques de la MA différentes.

Modèles eucaryotes inférieurs

La *Drosophila melanogaster*, le *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) et le *Danio rerio* (poisson-zèbre) sont des modèles utilisés dans la recherche de la MA. Ces modèles sont faciles à manipuler, à modifier génétiquement et se reproduisent rapidement. De plus, le temps de développement de ces modèles (œuf fécondé à adulte) est très court. Ils peuvent être manipulés en grand nombre dues à leurs faibles restrictions éthiques. Les modifications géniques les plus souvent retrouvées dans l'étude de la MA se font au niveau des gènes *APP*, *PSEN1*, *MAPT* et *BACE1*. Le modèle *Drosophila melanogaster* est souvent modifié génétiquement pour exprimer la Tau pleine longueur ou des Tau mutées pour étudier la neurodégénérescence, la phosphorylation de Tau, la formation des NFTs, l'influence du stress oxydatif ainsi que la toxicité de Tau (Koechling, T. et al., 2010). Le modèle *C. elegans* est utilisé pour la caractérisation ainsi que le criblage de médicaments. Pour ce qui est du poisson zèbre, ce modèle est aussi utilisé pour l'observation en continue de la neurodégénérescence puisqu'il est complètement transparent. Cependant, les résultats obtenus avec ces modèles doivent être interprétés avec

prudence due à la très grande différence d'homologie génétique avec l'humain et devront être confirmés en utilisant des modèles animaux plus pertinents.

Souris transgéniques

Les souris transgéniques sont les modèles animaux les plus utilisés dans l'étude de la MA et ils en existent plusieurs variétés. Les trois transcrits majeurs de la protéine Tau, soit 0N4R, 1N4R et 2N4R, sont retrouvés dans le cerveau murin adulte. Tout d'abord, pour l'étude des plaques A β , il y a les souris transgéniques avec des mutations au niveau du gène *APP* humain et/ou du gène *PSEN1* humain. Par exemple, la souris *Tg2576*, qui exprime le gène *APP* humain avec une double mutation (*APP* K670N/M671L) et la souris *5xFAD* qui possède 5 mutations, soient trois au niveau du gène *APP* (*APP* K670N/M671L, *APP* V717I et *APP* I716V) et deux au niveau du gène *PS1* (*PS1* M146L et *PS1* L286V) (Koechling, T. et al., 2010; Drummond, E. et Wisniewski, T. 2017). Pour l'étude des NFTs, les souris utilisées sont des transgéniques qui expriment la Tau humaine avec les mutations principalement retrouvée dans la FTLD-Tau (P301L et R406W) (Koechling, T. et al., 2010; Drummond, E. et Wisniewski, T. 2017). Il existe aussi des souris transgéniques de phosphatases et kinases liées à la MA, tels que les souris surexprimant le gène humain *p25* et les souris knockout de l'*APP2A* (Gotz, J. 2001). Cependant, le modèle de souris transgénique le plus représentatif de la pathologie de la MA est la souris *3xTg*. Celle-ci possède des mutations dans le gène *APP*, *MAPT* et *PSEN1* ou *PSEN2* permettant de former des plaques A β et des NFTs (Koechling, T. et al., 2010; Drummond, E. et Wisniewski, T. 2017).

Autres modèles animaux

Mis à part les souris, plusieurs autres animaux peuvent être utilisés dans la recherche de la MA, tels que les rats, les cochons d'inde, les *Octodon degu* (Dègue du Chili), les chiens et les primates non humains. Ces modèles ont une physiologie

fonctionnelle et neuroanatomique plus proche de l'humain que les souris transgéniques. La taille plus grande de leurs cerveaux permet une meilleure collecte d'échantillons et facilite l'électrophysiologie et l'imagerie. Des tests comportementaux plus complexes sont aussi possibles avec ces modèles. Due à leur hétérogénéité génétique, ces modèles sont aptes à développer des caractéristiques semblables à celles de la MA, tels que le déclin cognitif et le développement de plaque A β . De plus, le vieillissement chez les chiens et les primates non humains est plus représentatif de celui des humains. Cependant, ces modèles animaux de la MA ne possèdent pas toutes les caractéristiques de la pathologie. Par exemple, les modèles animaux ne développent pas de NFTs, caractéristique pathologique importante dans la MA (Vitek, M.P et al., 2020).

Lignées cellulaires non neuronales et neuronales

Comparativement aux modèles animaux qui permettent d'étudier la MA dans l'ensemble de l'organisme, les lignées cellulaires permettent d'étudier des processus liés à la MA. Ces lignées cellulaires sont faciles à transfecter et sont aussi faciles à manipuler et à maintenir. De plus la lignée cellulaire prolifère rapidement. Les lignées cellulaires non neuronales, telles que HeLa et HEK293, sont de bons modèles pour étudier les propriétés de Tau exogène en absence de Tau endogène. Par exemple, ces modèles permettent de faciliter l'étude des propriétés de chaque région de Tau *via* la transfection de mutants de délétion pour toutes les isoformes de Tau humaine. Comparativement aux lignées cellulaires non neuronales, les lignées cellulaires neuronales, telles que N2a, PC12 et SH-SY5Y sont très utiles pour la modélisation de la cytopathologie des tauopathies. Ces lignées cellulaires peuvent être induites pour se différencier en cellules non mitotiques avec un phénotype neuronal. Ces modèles permettent d'étudier l'effet des altérations retrouvées dans les tauopathies, sur les éléments cellulaires spécifiques aux neurones, tels que les synapses, les dendrites, les microtubules et les axones. Ces lignées cellulaires permettent aussi l'étude de l'effet de la surexpression de Tau sur ses fonctions physiologiques (Hall, G.F. et Yao, J. 2005; Slanzi, A. et al., 2020).

Culture primaire

La culture primaire est l'isolement de cellules à partir d'organe vivant et sont mises en culture *in vitro*. La culture de neurone est une autre approche qui assure la présence d'un phénotype neuronal. La présence du phénotype neuronal est un facteur critique dans l'étude des fonctions physiologiques de Tau. Ce modèle permet d'étudier de façon beaucoup plus complète l'interaction de Tau avec les structures cellulaires, comme la transduction du signal et son interaction avec les membranes. Les neurones d'hippocampe de rat sont la culture primaire la plus utilisée dans l'étude de la MA. Les cultures primaires de neurones sont plus représentatives de l'état physiologique *in vivo* que les lignées cellulaires. Cependant, la culture primaire est plus compliquée, puisque ce sont des cellules beaucoup plus fragiles et qui possèdent une limite dans leur division cellulaire (Hall, G.F. et Yao, J. 2005).

iPSCs et reprogrammation directe

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) sont produites à partir de cellules somatiques et ont le potentiel de se différencier en n'importe quelles cellules du corps humain. Les cellules humaines les plus souvent utilisées pour induire les iPSCs sont les fibroblastes, obtenus *via* un échantillon de peau, et les cellules sanguines. Dans les études de maladies neurodégénératives, les fibroblastes de patients sont tout d'abord reprogrammés en iPSCs, puis reprogrammés en neurones. L'utilisation de ce modèle permet d'avoir une meilleure compréhension dans l'étude des cibles cellulaires et moléculaires comparativement aux modèles animaux et cellulaires. Cependant, la grande limitation des iPSCs est que, lors de la reprogrammation, les marques épigénétiques ne sont pas conservées. Les neurones obtenus par cette technique sont donc de jeunes neurones. Or l'âge est un facteur important dans les maladies neurodégénératives (Livesey, M.R. et al., 2016; Slanzi, A. et al., 2020; Arber, C. et al., 2017). Une seconde technique de reprogrammation est possible, soit la reprogrammation directe aussi appelée la transdifférenciation. Celle-ci permet de reprogrammer les cellules somatiques

sans passer par l'état de pluripotence permettant ainsi de conserver les changements épigénétiques. Cette technique permet d'obtenir un modèle par excellence pour l'étude des maladies neurodégénératives. La pathologie retrouvée dans les neurones produits à partir de fibroblastes d'un patient peut récapituler certains aspects de la pathologie observée chez ce dernier. Ce modèle pourrait donc être utilisé pour de la médecine personnalisée.

Cependant, les iPSCs et la reprogrammation directe sont deux techniques prenant beaucoup de temps. La mise en culture de fibroblastes, à partir d'une biopsie, prend à elle seule 4 à 8 semaines pour obtenir une quantité suffisante pour effectuer une des deux techniques (Vandipuram, M, et al., 2013). Pour ce qui est de la production d'iPSCs humains et de la reprogrammation directe, celles-ci prennent entre 3 à 4 semaines. La production de neurones humains *via* ces deux techniques prend donc plusieurs mois de travail. De plus, l'utilisation de ces modèles doit être approuvée par le comité d'éthique et les patients doivent donner leur accord pour le prélèvement de peau.

1.5 La filamine

1.5.1 Rôles et structure

La filamine fait partie des protéines interagissant avec l'actine permettant la liaison entre la matrice cellulaire et le cytosquelette. Elle assure trois différentes fonctions : l'organisation en réseaux, en câble et l'ancrage des filaments aux membranes (D'Addario, A., 2001). La régulation de ces fonctions dépend de sa concentration et de ses interactions. Cette protéine est retrouvée dans divers organismes tels que les amibes, les insectes, les nématodes ainsi que les vertébrés (Razinia, Z. et al., 2017). Chez les vertébrés, la filamine est un large homodimère de 240 à 280 kDa et chaque sous-unité est constituée d'un domaine de liaison à l'actine (ABD) en N-terminal qui contiennent deux domaines homologues à la Calponine (CH1 et CH2) et permet la liaison à l'actine (Razinia, Z. et al., 2017; Gimona, M. et al., 2002) (**Figure 13**). Après le domaine ABD, la filamine est composée d'une répétition de 24 modules d'immunoglobuline (IgFLN1-24). Ce domaine est interrompu par deux charnières flexibles situées entre IgFLN15-16 et IgFLN23-24 appelées respectivement H1 et H2 (Razinia, Z. et al., 2017; van der Flier, A. et Sonnenberg, A., 2001). Ces interruptions forment deux régions distinctes, la tige 1 appelée rod1 et la tige 2 appelée rod2 (van der Flier, A. et Sonnenberg, A., 2001). Après la charnière H2 se trouve le domaine de dimérisation en C-terminal (**Figure 13**).

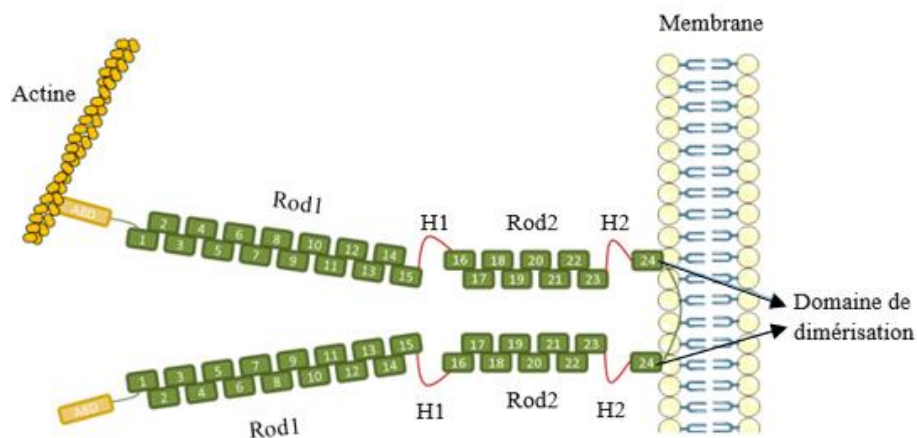


Figure 13: Structure de FLNA.

1.5.2 Isoformes de filamine

Chez l'humain on retrouve trois isoformes produites par trois gènes distincts et qui partagent environ 64% d'homologie, soit Filamine A (*FLNA*), Filamine B (*FLNB*) et Filamine C (*FLNC*) (Kesner, M., et al., 2010). Le gène *FLNA* est localisé sur le chromosome X et la protéine est exprimée dans tous les tissus et majoritairement dans le cerveau. *FLNA* favorise la ramification orthogonale et relie les filaments d'actine aux glycoprotéines membranaires. Ces branches orthogonales permettent de la flexibilité, une meilleure organisation ainsi qu'une mécanoprotection. Le gène *FLNB* est situé dans le chromosome 3 et la protéine est exprimée principalement dans les os. La protéine *FLNB* est exprimée en grande quantité lors du développement dans de multiples organes et tissus (cortex et fibres de stress). Des données immuno-cytochimiques ont montré une co-localisation de *FLNA* et *FLNB* dans les cellules somatiques et les noyaux à l'âge adulte (Sheen, F. et al. 2002). Des études sur des mutations humaines et par des expériences de déplétion chez les modèles murins montrent que *FLNA* et *FLNB* sont importantes pour le développement squelettique, vasculaire, cardiaque et cérébral (Sheen, F. et al. 2002; Feng, C. et al. 2006). Lors du développement cérébral, ces deux isoformes jouent des rôles importants dans la progression neuronale et la migration cellulaire ainsi que pour l'adhésion (Kesner, B.A. et al., 2010; Sheen, F. et al. 2002). Le gène *FLNC* est localisé au niveau du chromosome 7. La protéine est retrouvée majoritairement dans les muscles cardiaques, les muscles squelettiques et dans les disques Z des sarcomères (Thompson, C. et al., 2000). *FLNC* est importante pour la myogenèse et le maintien de l'intégrité structurale des fibres musculaires. Cependant, il a été montré que *FLNC* est exprimée dans des cellules non-musculaires pour garder un certain seuil pour la viabilité des cellules (Kesner, B.A. et al., 2010).

1.5.3 Partenaires de liaison de FLNA

FLNA joue un rôle important dans l'adhésion et la migration neuronale. *Via* son domaine rod2, FLNA interagit avec 90 protéines qui sont impliquées dans différentes voies de régulation, de signalisation et dans l'organisation du cytosquelette (Chen, H. et al., 2011; Ruskamo, S. et al., 2012) (**Figure 14**). Parmi ses partenaires, on retrouve plusieurs petites protéines GTPases telles que la famille des Rho: Rac, Rho, Cdc42 et RalA, et des kinases : ROCK, protéine kinase A et kinase sphingosine 1. FLNA interagit avec des récepteurs glycoprotéiques Ib alpha plaquettaire (GPIbalpha), les pro-prion, ASB2alpha, l'intégrine bêta et la migfiline (Bellanger, J.M. et al., 2000; Otha, Y. et al., 2006; Kiema, T. et al., 2006; Li, C. et al., 2010; Nakamura, F. et al., 2006). FLNA peut aussi interagir avec des récepteurs transmembranaires, tels que dopamine D2 et D3, la Calcitonine Ct, la Chemokine C-C de type2 et la Somatostatine de type2 (Lin, R. et al., 2001, Minsaas, L. et al., 2010; Thomas, S. et al., 2003). De plus, certaines études ont montré que l'interaction de FLNA avec des protéines stabilise ces dernières et produit ainsi une inhibition de la dégradation par l'ubiquitination-protéasome.

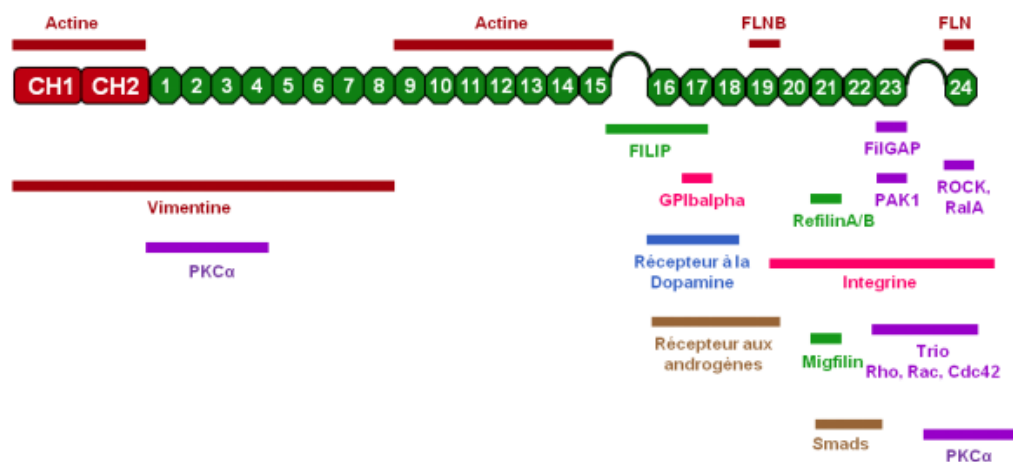


Figure 14: Partenaires de FLNA dont les domaines d'interaction ont été cartographiés sur la protéine FLNA. Domaine d'interaction des protéines du cytosquelette (rouge), des petites protéines de signalisation (violet), des protéines nucléaires (marron) et/ou membranaires (rose) avec FLNA. Les protéines impliquées dans la régulation de FLNA (vert). (Gay, O., 2011)

1.5.4 Mécanismes régulant l'activité de FLNA

L'activité physiologique de FLNA est régulée par différents mécanismes : la mécanodétection, la phosphorylation, la protéolyse, l'ubiquitination ainsi que la compétition avec d'autres protéines pour certains sites de liaison.

La mécanodétection est associée à un changement de conformation induit par la force mécanique. Elle permet d'exposer des sites de liaison qui se trouvaient initialement inaccessibles permettant ainsi à des protéines d'interagir avec FLNA (Razinia, Z et al., 2012). Plusieurs études ont montré l'importance de la mécanodétection lors de la différenciation cellulaire et de la morphogenèse. De plus, FLNA possède une multitude de sites de phosphorylation. La régulation de la phosphorylation est effectuée par plusieurs kinases, telles que la protéine kinase C, la kinase ribosomale S6, la kinase 1 activée par p21 (PAK1), la protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMPc, Akt, mTOR et la kinase sérine/thréonine Ndr2 (Fumihiko, N., 2011; Woo, M.S. et al., 2004; Jay, D. et al., 2004). Le site S2152 est le principal site de phosphorylation de FLNA. La phosphorylation de FLNA par les kinases favorise sa stabilisation et inhibe sa dégradation par la protéolyse. De plus, la phosphorylation de FLNA par les récepteurs de la tyrosine kinase provoque l'arrondissement des cellules ainsi que l'inhibition de la migration cellulaire par l'activation de l'intégrine (Fumihiko, N., 2011). FLNA est aussi régulée par les protéases caspases et calpaïnes. Ceux-ci clivent FLNA en deux fragments : un de 200 kDa qui est dégradé par la protéolyse et un fragment de 90 kDa C-terminal qui est transloqué dans le noyau (Franco, S.J. et Huttenlocher, A., 2005). Le fragment de 90 kDa interagit avec *BRCA1* et *BRCA2* pour contribuer à la réparation de l'ADN (Yuan, Y. et Shen, Z., 2001). Ce fragment peut aussi interagir avec des facteurs de transcription, tels que Smads ou PEBP2 β /CBF β , les récepteurs androgènes ainsi qu'avec le co-activateur transcriptionnel MKL1 (Sasaki, A. et al., 2001; Loy, C.J. et al., 2003). De plus, lorsqu'il y a une accumulation de FLNA, celle-ci interagit avec FILIP ce qui accélère le processus de dégradation par la calpaïne et régule par le fait même la migration neuronale (Nagano, T. et al., 2004; Sato,

M. et al., 2005). Ensuite, FLNA peut être ubiquitinylée par la ligase E3 ASB2 α pour être dégradée par l'UPS. L'ubiquitination de FLNA se produit à certains stades du développement pour permettre une certaine régulation dans la différenciation cellulaire (Bello, N.F. et al., 2009). L'ubiquitination de FLNA par ASB2 α joue un rôle dans la régulation de l'adhésion, la migration cellulaire et la prolifération cellulaire (Heuzé, M.L et al., 2005). La dégradation de FLNA par le protéasome joue un rôle important dans la régulation de la morphogenèse dendritique, les cônes de croissance axonale et dans la migration neuronale. Par exemple, en condition d'hypoxie, la dégradation de FLNA par le protéasome est inhibée permettant ainsi une réorganisation du cytosquelette d'actine pour réduire le nombre d'épines dendritiques, de synapses ainsi que la transmission synaptique (Segura, I. et al., 2016). L'affinité de FLNA pour certains sites peut engendrer une compétition avec les autres protéines pouvant se lier à ces sites. Par exemple, le site de liaison de FLNA sur l'intégrine chevauche le site utilisé par d'autres protéines de liaison à l'intégrine, telles que la taline, l'endonexine β 3 et la 14-3-3. Ayant une haute affinité pour l'intégrine, FLNA empêchera la liaison des autres protéines à l'intégrine. De plus, la compétition entre la migfiline et FLNA pour la liaison à l'intégrine joue un rôle important dans l'adhérence focale (Das, M. et al., 2011; Lad, Y. et al., 2008).

1.5.5 Filaminopathies

La filaminopathie est une myopathie myofibrillaire caractérisée par une faiblesse progressive des muscles squelettiques proximaux affectant les extrémités inférieures et se propage au niveau des extrémités supérieures. Les trois isoformes de filamine ont été détectées dans le cerveau humain, mais aucun trouble neurologique n'a été associé au niveau d'expression et/ou à des mutations de *FLNB* et *FLNC* (Robertson, S.P. et al., 2003). Les mutations dans le gène *FLNA* produisent une délétion ou une duplication du matériel génétique associé à un gain de fonction. Les mutations de *FLNA* sont connues pour causer

plusieurs maladies, telles que l'hétérotopie nodulaire périventriculaire, les troubles du spectre otopalatodigital (OPD type1 et 2, dysplasie frontométaphysaire et syndrome de Melnick-Needles), le Parkinson, la dysplasie squelettique, des anomalies cardiovasculaires et des problèmes de développement pulmonaire, cutané et gastro-intestinal (Moutton, S. et al., 2016; Sheen, V.L. et al., 2005; Degos, B. et al., 2016; de Wit, M.C.Y. et al., 2011; Eltahir, S. et al., 2016). Plusieurs études ont montré une corrélation entre différentes maladies neurodégénératives et l'augmentation du niveau protéique de FLNA sans mutation du gène. Cette augmentation protéique est retrouvée dans la FTLD-Tau, la PSP et la MA (Li, K.W. et al., 2018; Liang D. et al., 2012).

1.5.6 FLNA dans la maladie d'Alzheimer

FLNA joue un rôle important dans l'hyperphosphorylation de Tau dans la MA. Des échantillons de cerveaux de patients MA et de modèle de souris MA triples transgéniques (3xTg) ont démontré une altération au niveau de la conformation de FLNA qui favorise l'activation de kinases causant l'hyperphosphorylation de Tau *via* la signalisation d'A β 42 au récepteur α 7nAChR (Wang, H.Y. et al., 2017; Wang, H.Y. et al., 2012). En condition physiologique FLNA peut s'associer à des récepteurs tels que les récepteurs opioïdes mu et les récepteurs d'insuline, mais pas au récepteur α 7nAChR (Stossel, T. et al., 2001). A β 42 et FLNA n'interagissent pas entre elles, mais A β 42 induirait le changement de conformation de FLNA après sa liaison au récepteur α 7nAChR. La conformation de FLNA altérée, une fois liée au récepteur α 7nAChR, se liera aussi à TRL4 amplifiant la neuro inflammation. La restauration de la conformation de FLNA *via* la drogue PTI-125 empêche son interaction avec le récepteur α 7nAChR (Wang, H.Y. et al., 2017; Wang, H.Y. et al., 2012). De plus, le C-terminal de FLNA, une fois clivé, peut interagir avec des facteurs de transcription dans le noyau, comme Smad2. Dans des neurones hippocampiques de patients souffrant de MA, FLNA favoriserait la phosphorylation de Smad2 (Sasaki, A et al., 2001). La localisation de Smad2 phosphorylée dans le noyau est importante pour la

régulation de la transcription du gène TGF- β et assurer une neuroprotection. Dans la MA, Smad2 phosphorylée est retrouvée dans le cytoplasme neuronal et co-localise avec les NFTs altérant la régulation de la transcription de TGF- β ce qui entraîne une perte de la fonction neuroprotective (Lee, H.G. et al., 2006). FLNA est aussi un régulateur important dans la dynamique de l'actine, composant important dans le réseau dendritique et synaptique (Nakamura, F. et al., 2011). Des études d'analyses protéomiques ont montré que FLNA co-localise avec les NFTs dans l'hippocampe et le cortex frontal dans les cerveaux MA, dans les cerveaux FTLD-Tau avec mutation TauP301L et TauN279K ainsi que dans souris transgénique THY-Tau22. Tau, sous forme de NFTs pourrait induire une déplétion de FLNA entraînant la déstabilisation du réseau d'actine et une perte synaptique (Penzes, P. et Vanleeuwen, J., 2011). FLNA interagit également avec la PSEN1 et PSEN2. La PSEN1 module la distribution intracellulaire de FLNA et la mutation de *PS1* induit une augmentation de FLNA chez les souris transgéniques *PS1* M146L et dans les cellules HEK293 (Feuillette, S. et al., 2010).

1.6. Objectifs et Hypothèses

La compréhension de la MA est complexe, puisque cette maladie est multifactorielle et multilésionnelle. Des modèles prédictifs suggèrent qu'en 2050, plus de 100 millions de personnes seront atteintes de la MA dans le monde. Une meilleure compréhension de la MA est nécessaire, car aucun traitement n'existe à ce jour pour ralentir la progression ou guérir la maladie. Une revue de la littérature démontre que FLNA jouerait un rôle important dans la MA, puisqu'elle impact la signalisation d'A β 42 au récepteur α 7nAChR ainsi que la signalisation médiée par Smad2. De plus, la mutation de *PS1* M146L, qui peut être retrouvée dans les cas de MA familiaux, induit une augmentation du niveau de FLNA. Sachant que la Tau phosphorylée interagit avec 125 protéines, il est très probable qu'elle interagisse avec FLNA ce qui produirait un

dysfonctionnement des voies de signalisation médiées par cette dernière, comme dans la morphogenèse dendritique, dans la régulation des cônes de croissance axonale et dans la migration neuronale. De plus, nous savons que FLNA, lorsqu'elle interagit avec une protéine, favorise sa stabilisation. Des études ont montré la présence de FLNA dans les NFTs. Notre hypothèse est que Tau interagit avec FLNA produisant la stabilité de Tau ce qui favoriserait son auto-agrégation ainsi que l'inhibition de sa dégradation par le protéasome et/ou l'autophagie. La prévention de cette interaction pourrait réduire l'accumulation de Tau ainsi que son effet néfaste sur les neurones. Dans ce projet, nous avons étudié le niveau de FLNA insoluble (iFLNA) dans des échantillons de cortex pariétal de patients témoins et MA. L'étude de l'interaction entre FLNA et Tau ainsi que de l'effet de la surexpression de FLNA sur Tau ont été effectués dans le modèle cellulaire de neuroblastome de souris (N2a).

Chapitre 2: Matériels et Méthodes

2.1 Échantillons de cerveau

2.1.1 Provenance des échantillons

Les échantillons de cerveau proviennent de la cohorte du Dr David A. Bennett. La cohorte regroupe des participants de la « Religious Orders Study », une étude longitudinale clinico-pathologique du vieillissement et de la démence (Bennett, D.A. et al., 2012).

2.1.2 Fractionnement des échantillons

Le fractionnement a été effectué par notre collaborateur, le laboratoire du Dr Frédéric Calon. 100 µg de cortex pariétal prélevé post-mortem de 60 participants ont été homogénéisé, soniqué et centrifugé de façon séquentielle pour obtenir la fraction soluble (protéines soluble), la fraction lyse (protéines transmembranaires) et la fraction culot (protéines insolubles) (**Figure 15**). Le fractionnement a été effectué selon la méthode publiée dans l'article Tremblay et al. 2017.

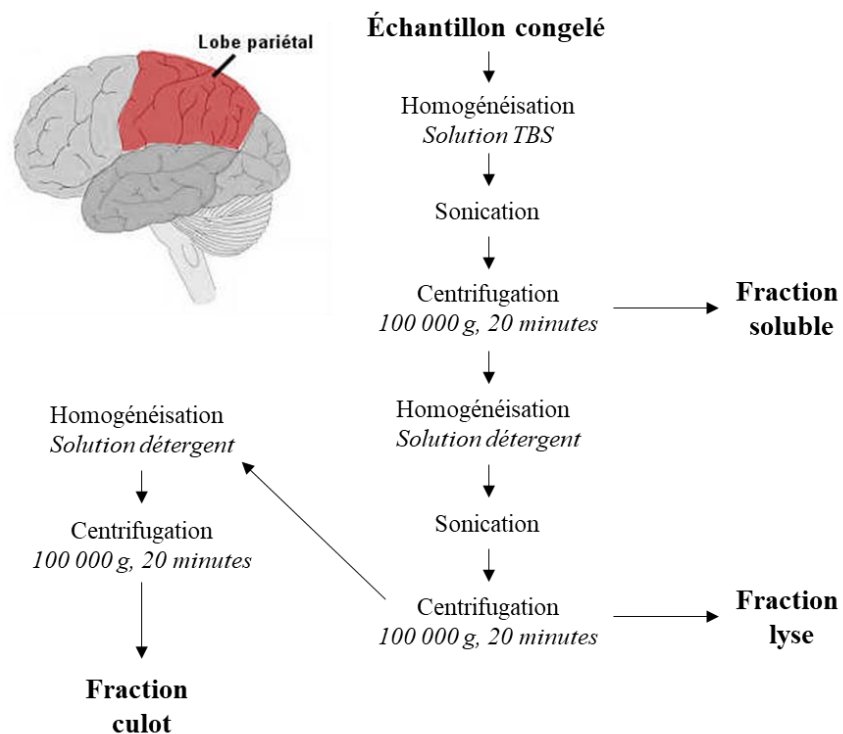


Figure 15 : Fractionnement des échantillons de cerveau (modifié de Tremblay et al., 2017)

2.1.3 Western Blot des fractions

Les Western Blot des fractions ont été effectués par le laboratoire du Dr Frédéric Calon. La concentration pour chacune des fractions a été déterminée en utilisant le dosage d'acide bicinchoninique de Pierce/Thermo Fisher Scientific. Pour chaque fraction, 15 µg de protéines ont été mélangés avec du tampon Laemmli et chauffés à 95°C pendant 5 minutes. La migration et le transfert des gels, les incubations avec les anticorps ainsi que l'acquisition du signal ont été effectués de la même manière qu'indiqué dans l'article Tremblay et al. 2017.

2.2 Culture cellulaire

Les cellules de neuroblastome de souris (N2a) (ATCC, USA) ont été cultivées à 37°C (humidifié à 5% de CO₂) dans du milieu EMEM (2mM de L-Glutamine, 1 mM de sodium pyruvate et 1500 mg/L de sodium bicarbonate) auquel 10% de sérum bovin fœtal ont été ajoutés.

2.2.1 Ensemencements et transfections

Les cellules N2a sontensemencées à une densité de 900 000 cellules par pétris de 35 mm de diamètre pour obtenir une confluence de 60-70% après 24h. Des doubles transfections ont été effectuées à l'aide de l'agent de transfection JetOPTIMUS. Pour ce faire, 0,5 µg de chaque plasmide d'ADN à une concentration de 1µg/µl ont été ajoutés dans 200 µl de tampon JetOPTIMUS et 1 µl de l'agent de transfection JetOPTIMUS. Ce mélange est incubé pendant 10 minutes puis ajouter aux cellules. 48h après la transfection, les cellules sont lysées.

2.2.2 Plasmides

Pour l'étude de l'interaction, les plasmides pEGFP-C1 Tau0N4R WT (GFP-TauWT), pEGFP-C1 Tau0N4RMBD-CT (215-441) (GFP-TauCT), pEGFP-C1 Tau0N4R NT (1-214) (GFP-TauNT) et pEGFP-C1 (GFP-vide) ont été transfectés seuls ou avec pcDNA3-myc-FLNA WT (myc-FLNA). De plus, les plasmides pCR-CMV Flag Tau0N4R (Flag-Tau4R), pCR-CMV Flag Tau0N3R (Flag-Tau3R), pEGF-C1 MAP2c, pIRES eGFP-AnnexinA2, pEGF-C1 VAMP8, pCR-CMV Flag-4RTAU-P301L (P301L), pCR-CMV Flag-4R-TAU-R406W (R406W) ainsi que pCR-CMV Flag-4R-Tau-V337M (V337M) ont été co-transfectés avec pEGFP-C1 (GFP-vide) ou pcDNA3-myc-FLNA WT (myc-FLNA) pour observer l'effet de la surexpression de FLNA sur Tau. Au cours du projet le plasmide GFP-vide a été changé pour pcDNA3-myc (myc-vide).

Le plasmide Flag-Tau4R a été obtenu *via* la Dr. Gloria Lee, University of Iowa. Le plasmide GFP-vide a été acheté chez Clontech. De plus, les plasmides myc-FLNA, Flag-Tau3R ont été achetés chez Addgene. Le plasmide GFP-MAP2c a été produit en insérant l'ADNc de MAP2c de rat dans le vecteur d'expression pEGFP-C1 (Clontech). Pour finir, les plasmides P301L, R406W et V337M, Flag-vide, myc-vide ainsi que GFP-TauCT et GFP-TauNT ont été obtenus par mutagenèse dirigée des plasmides Flag-Tau0N4R WT NM_016834.5, myc-FLNA et GFP-TauWT respectivement. Pour les mutants, la nomenclature utilisée est celle associée à l'isoforme 2N4R (NM_005910.6) qui est la plus souvent retrouvée dans la littérature.

2.2.3 Lyse cellulaire

Pour la lyse cellulaire, les pétris sont lavés deux fois avec du PBS et une fois avec du PBS contenant 0,5 M NaCl. 400 µl de tampon lyse ont été ajouté dans chacun des pétris (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Triton X-100 (0.5%), un mixte d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase). Le lysat cellulaire est centrifugé à 12 000 rpm pendant 20 minutes à 4°C et est, par la suite, dosé avec l'essai Bio-Rad DC. Des quantités égales de protéines ont été mélangées avec une solution de SB4X (35% de glycérol, 19% de Tris-HCl 1,5M pH 6,8, 5% de bromophénol, 15% de SDS) à laquelle a été ajouté 20% de β-mercaptoéthanol, puis chauffées pendant 5 min à 95 °C.

2.2.4 Extraction d'ARN

24h après la transfection, les cellules sont lavées une fois avec du PBS et une fois avec du PBS 0,5 M NaCl. 100 µl de trypsin 0,025% ont été ajouté aux pétris 35mm pendant 5 minutes à 37°C. 500 µl de milieu EMEM+10% FBS ont été utilisés pour récolter les cellules dans des tubes 1,5ml. Ces tubes sont centrifugés à 300g pendant 5 minutes à 4 °C. L'extraction d'ARN a été effectuée avec le RNeasy plus mini kit de QIAGEN. Les surnageants ont été jetés et 350 µl de RLT+ βmercaptoéthanol a été ajouté. Le culot a été homogénéisé en vortexant 1 minute, puis le mélange a été transféré sur les colonnes gDNA eliminator avec tube collector. Les colonnes sont vortexées 30 secondes à plus de 10 000 rpm, puis jetées pour conserver que le collector. 350 µl d'éthanol 70% ont été ajoutés aux surnageants présent dans les collectors, puis une fois bien homogénéisés, les mélanges ont été transférés sur les colonnes RNeasy avec tube collector. Ces colonnes sont centrifugées pendant 15 secondes à plus de 10 000 rpm et les surnageants présents dans les collectors ont été jetés. Les colonnes ont été lavées à 2 reprises, soit en ajoutant 500 µl de RPE dans les colonnes et en les centrifugeant 15 secondes pour le premier lavage et 2 minutes pour le second lavage à plus de 10 000 rpm. Avec un nouveau tube

collector, les colonnes sont centrifugées avec bouchon ouvert à pleine vitesse pendant 1 minutes. L'élution de l'ARN est effectuée avec 30 µl d'eau RNase free préchauffées et obtenue par une centrifugation de 1 minute à plus de 10 000 rpm. Les échantillons sont dosés au nanodrop et envoyés à l'IRIC pour l'analyse RTqPCR. Les amorces FWD 794-814 (5'-GCTCATTAGGCAACATCCATC-3') et REV 845-868 (5'-CCTTGAAGTCAAGCTTCTCAGAT-3') situées dans la région C-terminal ont été utilisées lors des analyses RTqPCR.

2.3 Western Blot du lysat cellulaire

2.3.1 Western blot dénaturant

Les protéines dénaturées ont été déposées dans les puits de gels polyacrylamides de 7,5% ou 10%. La migration a été effectuée à 30mA par gel pendant 1h10 et le transfert sur membrane de nitrocellulose a été effectué à 100 Volts pendant 1h. Les membranes ont été incubées avec du lait 5% écrémé en poudre et du TBS-T (solution saline tamponnée au Tris avec 0,2% de Tween-20) pendant 1h ou toute la nuit à 4°C selon l'expérience. Par la suite, les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire pendant 1h30 ou toute la nuit à 4°C selon l'expérience. Après trois lavages de 5 minutes au TBS-T, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire couplé à des peroxydases de Raifort. La révélation a été effectuée avec la solution réactive ECL et l'acquisition a été effectuée avec le système ChemiDoc MP. L'analyse densitométrique a été effectuée avec le logiciel Image Lab.

2.4 Immunoprécipitations

2.4.1 GFP-Trap

Trois pétris de 100mm de diamètre ont étéensemencés à une densité de 3 000 000 cellules pour obtenir une confluence de 60-70% après 24h. Les cellules N2a transfectées avec les plasmides pEGFP-C1 Tau0N4R WT (GFP-TauWT), pEGFP-C1 Tau0N4RMBD-CT (215-441) (GFP-TauCT) ou pEGFP-C1 Tau0N4R NT (1-214) (GFP-TauNT) ont été lavées une fois avec du PBS et du PBS 0,5M NaCl. Après lavage, les cellules ont été grattées et récoltées dans 3ml de PBS, puis centrifugées à 1 200 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants ont été jetés et les culots ont été lysés dans du tampon de lyse (3 mM d'Imidazole à pH 7.4, 250 mM de Sucrose et un mélange d'inhibiteur de protéase) avec une seringue 25 G ainsi qu'une seringue 27 ½ G. Les lysats cellulaires ont été par la suite centrifugés à 3 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les lysats ont été quantifiés à l'aide de l'essai Bio-Rad DC. Pour chacun des lysats, une solution de 620 µg/ml a été préparée, puis ultracentrifugée à 100 000 g pendant 1 h à 4 °C. Les surnageants ont été jetés et les culots ont été décollés des parois avec 1 ml de solution HBS-T (HEPES 20 mM pH 7.2, NaCl 150 mM, Sucrose 250 mM, 0,02% de triton et un mélange d'inhibiteur de protéase) avant d'être soniqués (1-2 pulse de 1-2 sec à 30% amplitude). 20 µl de suspension de billes témoins et de billes magnétiques couplées à l'anti-GFP nanobody ont été lavées avec du HBS-T. Les culots resuspendus ont été incubés 1 h sur les billes magnétiques témoins à 4 °C, puis incubés 2 h sur les billes magnétiques GFP à 4 °C. Des prélèvements de 20 µl des solutions avant ultracentrifugation, après sonication ainsi que les surnageants des billes magnétiques GFP ont été effectués et mélangés avec du SB4X+ β-mercaptoéthanol, puis chauffés à 95 °C pendant 5 minutes. Ces échantillons ont été identifiés comme étant les fractions Input 1% (protéine total), Input 2% (protéine membranaire) et non liée. Pour ce qui est des éluions, sur un raque magnétique, les billes magnétiques GFP ont été lavées à plusieurs reprises avec du HBS (solution HBS-T sans le triton). Une fois lavées, les billes ont été mélangées avec du SB2X+ β-mercaptoéthanol et

chauffées à 95 °C pendant 10 minutes avec une homogénéisation toutes les 2 minutes. Sur un raque magnétique, le mélange est récolté et les billes ont été lavées avec de l'eau stérile qui est ajoutée au mélange formant ainsi l'élution.

2.4.2 Western Blot GFP-Trap

Les fractions Input 1%, Input 2%, non liée et l'élution ont été déposées dans des gels précastés à gradient 4-20%. Les Western Blot ont été effectués de la même manière que les Western Blot dénaturants.

2.4.3 Myc-Trap

Les cellules N2a co-transfectées avec les plasmides pEGFP-C1 Tau0N4R WT et myc-FLNA ou pEGFP-C1 Tau0N4RMBD-CT et myc-FLNA ou pEGFP-C1 Tau0N4R NT et myc-FLNA ont été traitées de la même manière que celle décrite pour l'expérience GFP-Trap.

2.4.4 Western Blot Myc-Trap

Les fractions Input 1%, Input 2%, non liée et l'élution ont été déposées dans des gels précastés à gradient 4-20%. Les Western Blot ont été effectués de la même manière que les Western Blot dénaturants.

2.4.5 Ubiquitine-Trap

Trois pétris de 100mm de diamètre ont étéensemencés à une densité de 3 000 000 cellules pour obtenir une confluence de 60-70% après 24h. La récolte des cellules N2a et les immunoprécipitations ont été effectuées en suivant le protocole Signal-Seeker™ Ubiquitination Detection Kit de Cytoskeleton, Inc. Les cellules N2a co-transfectées avec les plasmides TauCT et myc-vidé ou TauCT et myc-FLNA ainsi que TauNT et myc-vidé ou TauNT et myc-FLNA ont été lavées une fois avec du PBS. Après lavage, les cellules ont été grattées dans 400 µl de tampon de lyse BlastR™, puis filtrées à l'aide d'un filtre BlastR™. La quantification protéique des lysats cellulaires a été effectuée par spectrophotométrie. Les lysats cellulaires ont été par la suite dilués pour obtenir une concentration finale de 1mg/ml. 20 µl de ce lysat ont été mélangés avec du SB4X+ β-mercaptoéthanol, puis chauffés à 95 °C pendant 5 minutes pour obtenir la fraction Input. Par la suite, 20 µl de suspension de billes témoins ainsi que, pour chacune des conditions, 20 µl de suspension de billes ubiquitine-Trap ont été aliquotés dans un tube sur glace. Ces aliquots de billes ont été lavés au PBS-T et 1 mg des lysats a été ajouté dans chaque tube. Les billes sont incubées sur plateau tournant pendant 2 h à 4 °C. Par la suite, les billes ont été centrifugées à 5 000 g pendant 1 minute à 4°C. Les surnageants ont été aspirés et les billes ont été lavées avec 1 ml de BlastR-2™. Ces étapes de lavages ont été répétées deux autres fois. Après le dernier lavage, 30 µl du tampon d'élution ont été ajoutés, puis incubés pendant 5 minutes à température pièce. Ce mélange a été transféré sur les colonnes du kit, puis centrifugé à 10 000 g pendant 1 minute à température pièce. Pour finir, 2 µl de beta-mercaptoéthanol ont été ajoutés dans chacun des échantillons et chauffés à 95 °C dans un bain marie pendant 5 minutes pour obtenir les fractions élutions.

2.4.6 Western Blot Ubiquitine-Trap

Les fractions Input et élution ont été déposées dans des gels précastés à gradient 4-20%. Les Western Blot des Input, ainsi que l'élution, incubés avec l'anticorps A0024 ont été effectués de la même manière que les Western Blot dénaturants. Pour les Western Blot des éluions incubés avec l'anticorps ubiquitine totale, la migration et le transfert ont été effectués de la même manière que les Western Blot dénaturants. Cependant, les membranes ont été incubées avec l'anticorps dilué dans du lait 3% écrémé en poudre et du TBS-T pendant 1h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Les membranes ont été par la suite lavées six fois pendant 10 minutes au TBS-T. La révélation a été effectuée avec un mixte 1 :1 de réactif chimioluminescent A et de réactif chimioluminescent B présent dans le kit et l'acquisition a été effectuée avec le système ChemiDoc MP.

2.5 Anticorps

Les anticorps utilisés pour les Western Blot et les immunoprécipitations sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

	Acs primaire	Dilution	Acs secondaire	Source	Numéro
Western Blot	K9JA (Tau Total)	1 :40000	lapin	Dako, Denmark	A0024
	γ-actin	1 :10000	souris	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA	Sc-65635
	c-myc	1 :2000	souris	Biolegend, San Diego, CA, USA	9E10
	FLNA	1 :2000	lapin	Cell Signaling technology, Danvers, MA, USA	4762
	Tau-1	1 :1000	souris	Millipore, Billerica, MA, USA	MAB3420
	AT180 (T231/S235)	1 :100	souris	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA	MN1040
	S199-202	1 :1000	lapin	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada	44-768G
	Phospho-T205	1 :500	lapin	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada	MN1020
	Phospho-FLNA (ser2152)	1 :2000	lapin	Cell Signaling technology, Danvers, MA, USA	4761
	TauC3	1 :1000	souris	ThermoFisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada	AHB0051
	GFP	1 :1000	rat	Chromotek, Allemagne	3H9
	Tubuline Total	1 :5000	souris	Sigma, Billerica, MA, USA	T9026
	Tubuline acétylée	1 :2000	souris	Sigma, Billerica, MA, USA	T6793
Immuno-précipitation	GFP	1 :1000	rat	Chromotek, Allemagne	3H9
	c-myc	1 :2000	souris	Chromotek, Allemagne	9E1
	FLNA	1 :2000	lapin	Cell Signaling technology, Danvers, MA, USA	4762
	Ubiquitine totale	1 :4000	HRP	Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA	BK161

Tableau 3 : Tableau des anticorps primaires et secondaires avec leurs dilutions utilisées pour les Western Blot et Immunoprécipitations.

2.6 Analyse de l'agrégation de Tau avec le Kit Cisbio.

L'analyse de l'agrégation de Tau par fluorescence homogène en temps résolu (HTRF) a été effectuée avec le kit d'agrégation de Tau Cisbio. (Cisbio GmbH, Berlin, Germany). La reconstitution des tampons et des anticorps a été effectuée en suivant les instructions du fabricant. Les lysats cellulaires ont été récoltés comme décrit dans la section lyse cellulaire. La préparation protéique ne s'est pas faite dans du β -mercaptoéthanol, comme précédemment décrit, et quatre dilutions ont été préparées dans le tampon du kit avec des concentrations finales de protéines de 0.0025 ng/ μ l, 0.035 ng/ μ l, 0.005 ng/ μ l et 0.0125 ng/ μ l. 10 μ l du mélange d'anticorps avec un ratio de 1 :1 ont été ajoutés aux 10 μ l de préparation protéique qui ont été déposés dans une plaque blanche de 96 puits. La plaque a été incubée pendant 20 h à température ambiante puis lue avec le lecteur de plaque EnVision à 665 nm et 620 nm pour obtenir le rapport du FRET résolu dans le temps (665 nm) sur l'émission du donneur (620 nm).

2.7 Analyses statistiques

2.7.1 Analyses des résultats des cerveaux de la cohorte

Les résultats de l'analyse densitométrique de la fraction culot ont été analysés par un ANCOVA avec correction de l'âge, du sexe et de l'APOe4 pour observer le niveau d'iFLNA dans les cerveaux de la cohorte. Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS et $p < 0,05$ a été considéré comme significatif.

2.7.2 Analyses des résultats des lysats N2a

Pour les résultats de l'analyse densitométrique des lysats cellulaires, ils ont été analysés par un test t paramétrique apparié pour observer les effets de la surexpression de FLNA sur la protéine Tau sauvage et les mutants. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8 et $p < 0,05$ a été considéré comme significatif.

Chapitre 3: Résultats

3.1 Augmentation de la filamine insoluble dans les cerveaux MA.

Des analyses protéomiques de cerveaux MA par LC/MS-MS ont révélé un total de 155 protéines capturées dans les NFTs dont la FLNA (Wang, Q., 2005; Yu, A., 2019; Zhang, Q., 2018; Li, K.W., 2019). De plus, une étude récente a montré que le niveau protéique de FLNA ainsi que son agrégation étaient plus élevés dans les cerveaux MA que les cerveaux témoins (Haenig, C. et al, 2020). *Via* une collaboration avec le laboratoire du Dr Frédéric Calon nous avons étudié, par Western blot, les niveaux protéiques de FLNA dans des cerveaux témoins et MA d'une cohorte de 60 individus. Les individus ont été classifiés selon leur score ABC. Ce score, obtenu lors de l'évaluation neuropathologique, permet d'évaluer la progression de l'A β , de la dégénérescence neurofibrillaire et des plaques séniles post mortem. L'analyse densitométrique du signal de FLNA insoluble (iFLNA) normalisé par le poids de l'échantillon a montré une augmentation significative dans les cerveaux MA (**Figure 16.A**).

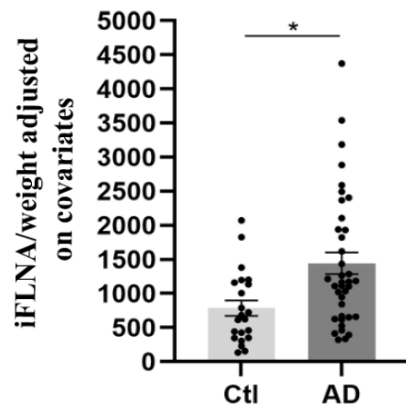
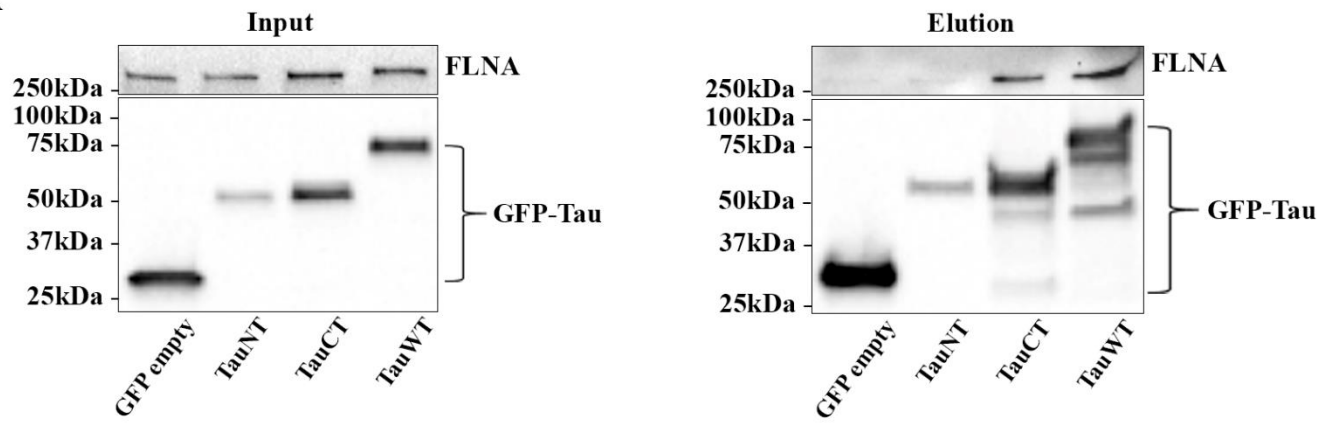


Figure 16. Augmentation du niveau de iFLNA dans la MA. iFLNA a été obtenue par fractionnement d'échantillon de cortex pariétal d'une cohorte de 60 participants. Les participants ont été classifiés selon leur score ABC. Quantification du signal iFLNA dans les cerveaux témoins et MA. Le signal a été corrigé selon 3 covariables : le sexe, l'âge et la présence de l'allèle APOE4 du sujet. ($f(1) = 6.726$; $p = 0.012$ pour *; partial $\eta^2 = 0.109$). Le signal iFLNA a été normalisé sur le poids de l'échantillon. Les données sont représentées en nuage de points où chaque point représente un n, $n = 22$ pour les témoins et $n = 38$ pour MA.

3.2 FLNA interagit avec la région de liaison aux microtubules de Tau.

Nous avons examiné l'interaction de FLNA avec Tau dans les cellules N2a. Pour ce faire, des lysats de cellules N2a transfectées avec GFP-vidé ou GFP-TauWT ou GFP-TauNT contenant les acides aminés (a.a.) 1-214 ou GFP-TauMBD-CT contenant les a.a 215-441 ont été immunoprécipités *via* la technologie GFP-Trap. Cette expérience a révélé une co-immunoprécipitation entre GFP-TauWT et FLNA endogène (**Figure 17.A**). Pour ce qui est des immunoprécipitations des lysats de cellules N2a transfectées avec GFP-TauNT et GFP-TauMBD-CT, ceux-ci nous ont permis de déterminer quelle région de Tau est impliquée dans l'interaction avec FLNA. L'anticorps GFP a permis de confirmer la présence de Tau dans chacune de nos conditions. Un fort signal de FLNA endogène a été observé lors de l'immunoprécipitation avec GFP-TauWT et GFP-TauMBD-CT indiquant que l'interaction avec FLNA serait médiée par un domaine de Tau qui se trouve entre les a.a. 215-441. Cependant, un faible signal a également pu être observé avec GFP-TauNT indiquant qu'un domaine dans cette région pourrait également contribuer à l'interaction de Tau avec FLNA (**Figure 17.A**). Pour confirmer ces observations, l'expérience inverse a été réalisée pour observer si Tau co-immunoprécipite avec FLNA. Des lysats de cellules N2a co-transfectées avec GFP-vidé et myc-FLNA ou GFP-TauWT et myc-FLNA ou GFP-TauNT et myc-FLNA ou GFP-TauMBD-CT et myc-FLNA ont été co-immunoprécipités *via* la technologie myc-Trap. L'anticorps myc a permis de confirmer la présence de FLNA dans chacune de nos conditions. Un fort signal GFP a montré que la GFP-TauWT ainsi que GFP-TauMBD-CT co-immunoprécipitent avec FLNA confirmant que l'interaction avec FLNA se trouve entre les a.a. 215-441 de Tau (**Figure 17.B**).

A



B

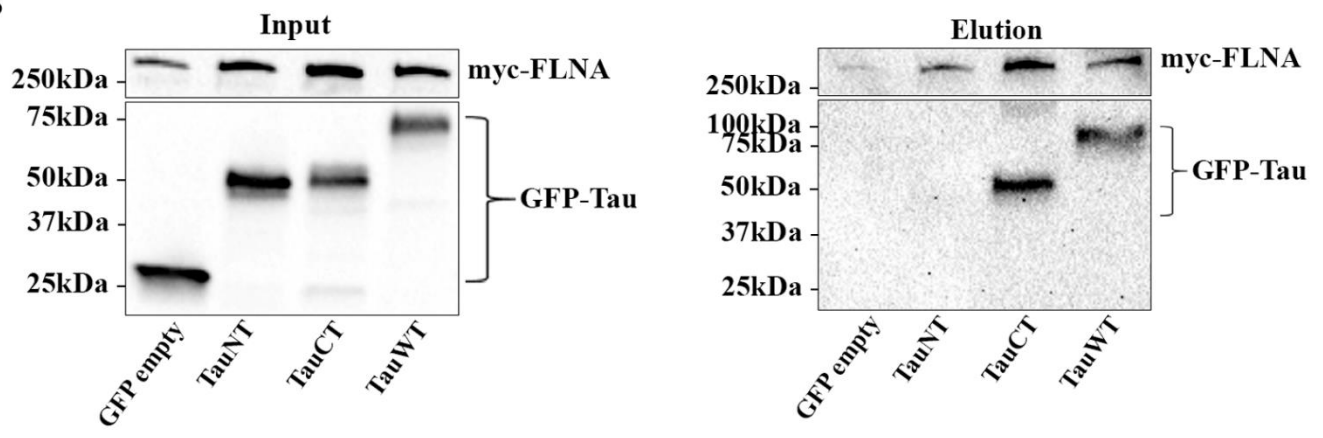


Figure 17. FLNA co-immunoprécipite avec Tau dans les cellules N2a. GFP-Trap a été utilisé pour co-immunoprécipiter FLNA par Tau et Myc-Trap pour co-immunoprécipiter Tau par FLNA. Pour GFP-trap, les cellules N2a ont été transfectées pendant 48h avec les plasmides GFP-vidé ou GFP-TauNT ou GFP-TauMBD-CT ou GFP-TauWT. Pour Myc-Trap, les cellules N2a ont été co-transfectées soit avec les plasmides GFP-vidé et myc-FLNA ou GFP-TauNT et mycFLNA ou GFP-TauMBD-CT et myc-FLNA ou GFP-TauWT et myc-FLNA pendant 48 h. **A**, L'analyse par Western blot avec l'anticorps GFP des fractions Input et Éluion obtenues avec GFP-Trap a confirmé la présence de Tau dans toutes les conditions. L'anticorps détectant la FLNA endogène montrait un signal dans tous les Input et un signal principalement dans les conditions GFP-TauWT et GFP-TauMBD-CT pour l'éluion, n=3. **B**, L'analyse par Western blot avec l'anticorps c-myc des fractions Input et Éluion obtenues avec Myc-Trap confirmait la présence de FLNA dans toutes les conditions. L'anticorps GFP a montré un signal dans tous les Input, mais uniquement dans les conditions GFP-TauWT et GFP-TauMBD-CT pour l'éluion, n=3.

3.3 La surexpression de FLNA augmente l'accumulation intracellulaire de Tau.

Nos résultats démontrant une interaction entre FLNA et Tau nous ont poussés à étudier l'effet de la surexpression de FLNA sur Tau. Des co-transfections de Tau en absence ou en présence de FLNA ont été effectuées dans les cellules N2a. L'anticorps A0024 a révélé par Western blot une augmentation du signal de Tau intracellulaire lors de la surexpression de FLNA (**Figure 18.A**). Selon l'analyse statistique, cette augmentation intracellulaire de Tau était significative comparativement à la co-transfection de Tau avec GFP-vidé (**Figure 18.B**).

De plus, la composition des isoformes de Tau trouvées dans les agrégats varie d'une tauopathie à l'autre. Pour étudier si l'accumulation intracellulaire induite par la surexpression de FLNA est dépendante de l'isoforme Tau, les cellules N2a ont été co-transfectées avec l'isoforme Tau0N4R ou l'isoforme Tau0N3R en présence ou non de FLNA. Les analyses densitométriques ont montré une augmentation significative de l'accumulation intracellulaire des deux isoformes de Tau en présence de FLNA (**Figure 18.C-D**).

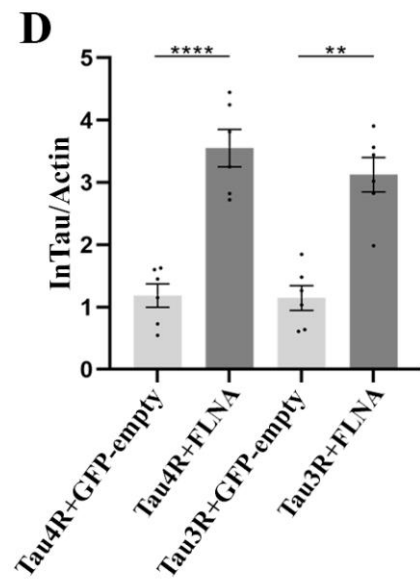
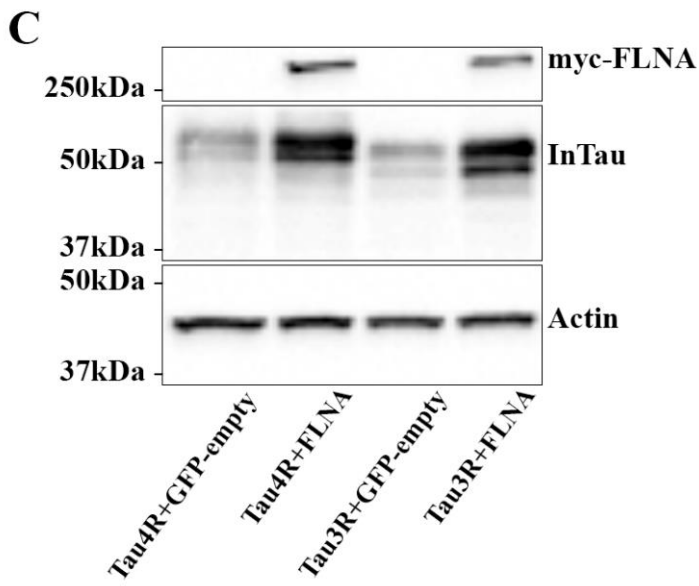
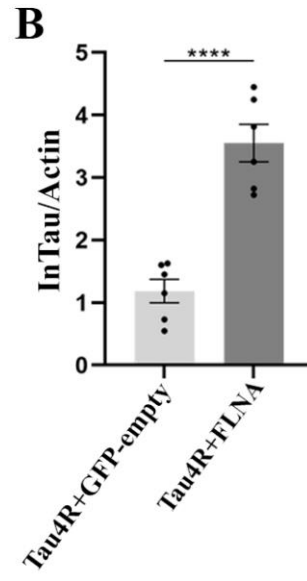
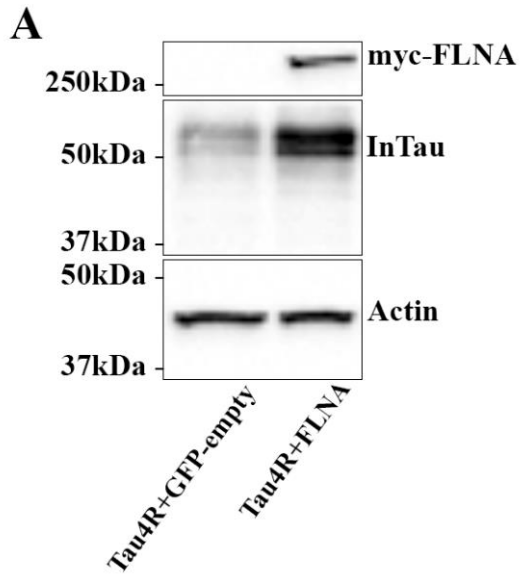


Figure 18. Accumulation intracellulaire des isoformes 3R et 4R lors de la surexpression de FLNA. Les cellules N2a ont été co-transfectées avec Flag-Tau4R et myc-FLNA ou Flag-Tau3R et myc-FLNA pendant 48h. Des co-transfections de Flag-Tau4R et GFP-vide ainsi que Flag-Tau3R et GFP-vide ont été utilisées comme conditions témoins. **A**, L'analyse par Western blot a montré une augmentation intracellulaire de Tau4R lors de la surexpression de FLNA. **B**, L'analyse densitométrique a montré que l'augmentation intracellulaire de InTau était significative lors de la surexpression de FLNA, n=6. **C**, L'analyse par Western blot du signal InTau montrait une augmentation intracellulaire de Tau4R et de Tau3R lors de la surexpression de FLNA. **D**, Les analyses densitométriques ont montré que l'augmentation intracellulaire de Tau4R et de Tau3R étaient significatives lors de la surexpression de FLNA, n=6. Le signal de Tau a été normalisé sur le signal de l'actine. L'anticorps c-myc a été utilisé pour confirmer la transfection de FLNA. Les résultats ont été présentés par un nuage de points \pm S.E.M où chaque point représente un n. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$.

3.4 L'effet de la surexpression de FLNA sur l'expression de Tau.

Puisque nos résultats montrant une accumulation protéique intracellulaire de Tau dans notre modèle cellulaire, nous avons vérifié si cette augmentation était causée par une augmentation de son expression génique lors de la surexpression de FLNA. Pour ce faire, le niveau d'ARNm de Tau des cellules co-transfectées avec GFP-TauWT et myc-*vide* ainsi que GFP-TauWT et myc-FLNA a été mesuré par RTqPCR. Considérant le cycle seuil (RQ) significatif lorsqu'il y a un changement du $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$, l'analyse a montré qu'il n'y a pas de modification significative de l'expression de Tau lors de la surexpression de FLNA (**Figure 19.A-B**). Cependant l'analyse du niveau d'ARNm de Tau par RTqPCR d'une co-transfection avec Flag-Tau4R et GFP-*vide* ainsi que Flag-Tau4R et FLNA a révélé une augmentation significative du niveau d'expression lors de la surexpression de FLNA (**Figure 19.C-D**). Ayant des résultats contradictoires, nous nous sommes interrogés sur la possibilité que Tau posséderait des séquences codantes exoniques. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de la surexpression de FLNA sur le niveau endogène de Tau. Des cellules non transfectées ont été utilisées comme témoins et des cellules N2a co-transfectées avec myc-FLNA et GFP-*vide* ont été utilisées. Les analyses Western blot et densitométriques du signal ont montré que la surexpression de FLNA n'affectait pas le niveau endogène de Tau (**Figure 19.E-F**). Ce résultat nous suggère que la surexpression de FLNA n'affecte pas l'expression génique de Tau et que l'augmentation de Tau observée ultérieurement est causée par une accumulation protéique de Tau.

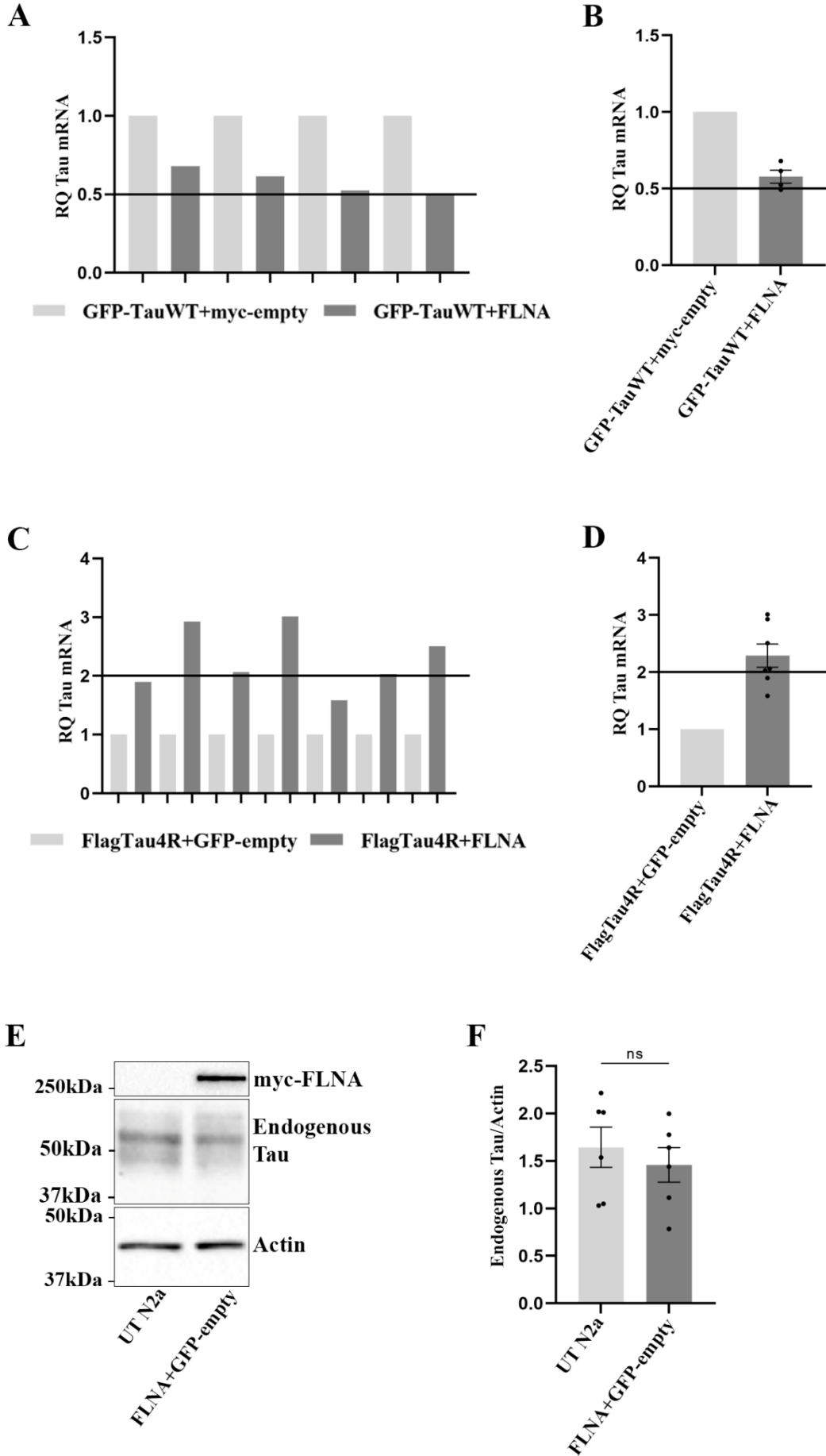


Figure 19. L'effet de FLNA sur l'expression de Tau. L'expression des ARNm a été mesurée en quantité relative (RQ). Le RQ correspond au « cycle seuil » et a été calculé comparativement à une condition calibrateur. Le calibrateur a un RQ de 1. Le RQ est considéré comme significatif lorsqu'il y a un changement du $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$. Les cellules N2a ont été co-transfectées soit avec GFP-TauWT et GFP-vidé ou GFP-TauWT et myc-FLNA ou Flag-Tau4R et GFP-vidé ou Flag-Tau4R et myc-FLNA pendant 48 h. Les conditions TauWT et GFP-vidé et Flag-Tau4R et GFP-vidé ont été utilisées comme calibrateur dans les analyses associées. **A**, Quantification de l'ARNm de GFP-TauWT en présence de FLNA, $n=4$. **B**, Les résultats de l'analyse RTqPCR de GFP-TauWT ont été représentés sous forme d'un nuage de points \pm S.E.M où chaque point représente un n. La surexpression de FLNA n'a pas modifié les niveaux de Tau. **C**, Quantification de l'ARNm de Flag-Tau4R en présence de FLNA $n=7$. La surexpression de FLNA a considérablement modifié les niveaux d'ARNm de Tau. **D**, Les résultats de l'analyse RTqPCR de Flag-Tau4R ont été représentés sous forme d'un nuage de points \pm S.E.M où chaque point représente un n. **E**, Les cellules N2a ont été co-transfectées avec myc-FLNA et GFP-vidé pendant 48 h. Des cellules non transfectées ont été utilisées comme témoins. L'analyse par Western blot du signal Tau endogène détecté par l'anticorps A0024. Le signal de Tau a été normalisé sur celui de l'actine et l'anticorps c-myc a été utilisé pour confirmer la transfection de FLNA. **F**, L'analyse densitométrique a confirmé qu'il n'y a pas de changement significatif dans le niveau de Tau endogène entre les deux conditions. Les résultats ont été représentés par un nuage de points \pm S.E.M où chaque point représente un n.

3.5 L'interaction de Tau avec FLNA semble jouer un rôle dans son accumulation intracellulaire.

Nous avons vérifié si l'interaction de FLNA avec Tau était nécessaire pour observer l'accumulation de Tau lors de sa surexpression. Nous avons donc vérifié si la surexpression de FLNA engendrerait l'accumulation intracellulaire d'une autre protéine avec laquelle elle interagit. Nous avons choisi de tester ce point en utilisant la protéine Annexine II, protéine importante dans l'interaction membrane-cytosquelette. Lors de la surexpression d'Annexine II avec FLNA dans les cellules N2a, nous avons noté une accumulation d'Annexine II comme notée avec Tau (**Figure 20.A-B**). Ces résultats indiqueraient qu'une interaction avec FLNA serait importante pour son effet sur l'accumulation de ses partenaires. Par la suite, nous avons examiné l'effet de FLNA sur la protéine GFP et la SNARE endosomale VAMP8 qui n'interagissent pas avec FLNA. Aucun effet sur le niveau protéique de ces protéines n'a été observé lors de la surexpression de FLNA (**Figure 20.E-H**). Toutes ces observations nous indiquent que l'effet de FLNA sur l'accumulation intracellulaire de Tau implique son interaction avec Tau.

Par la suite, nous avons étudié si la surexpression de FLNA pourrait induire une accumulation intracellulaire de protéines partageant une forte homologie avec Tau. Pour ce faire, la protéine MAP2c, protéine associée aux microtubules retrouvée dans les dendrites ainsi que dans l'axone pendant le développement du cerveau, a été utilisée. Les MBRs de cette protéine possède 80% d'homologie avec celles de la Tau et MAP2c possède aussi des régions homologues au niveau du N-terminal et de la PRR (Dehmelt, L. et Halpain, S., 2005; Xie C et al. 2015). Puisque nos co-immunoprécipitations par GFP-Trap et myc-Trap ont montré une interaction avec FLNA localisée entre les a.a 214-441 de Tau, région où se trouve les MBRs, nous avons co-transfecté des cellules N2a avec GFP-MAP2c en absence et en présence de FLNA. Les analyses par Western blot et densitométriques

de l'anticorps GFP ont révélé une augmentation du signal MAP2c lors de la surexpression de FLNA (**Figure 20.C-D**).

Finalement, pour confirmer de façon définitive que l'interaction de FLNA avec Tau était nécessaire pour induire l'accumulation intracellulaire de Tau, des cellules N2a ont été co-transfectées avec GFP-TauNT, ayant montré aucune interaction avec FLNA, ou avec GFP-TauMBD-CT, ayant montré une interaction avec FLNA, en absence ou en présence de FLNA. Les analyses par Western blot ont montré une accumulation de GFP-TauNT et de GFP-TauMBD-CT en surexpression de FLNA (**Figure 20.I-J**). L'augmentation de GFP-TauNT par la surexpression de FLNA nous indique que l'interaction avec Tau n'est pas le seul mécanisme expliquant l'accumulation intracellulaire de Tau ou que les approches utilisées pour détecter l'interaction de FLNA et Tau ne nous ont pas permis de détecter son interaction avec GFP-TauNT. Pour finir, nous avons aussi mesuré par RTqPCR le niveau d'ARNm de GFP-TauNT et de GFP-TauMBD-CT en absence ou en présence de FLNA. Considérant le RQ significatif lorsque $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$, les analyses ont montré qu'il n'y a pas de modification significative de l'expression de ces formes tronquées de Tau lors de la surexpression de FLNA (**Figure 20.K-L**).

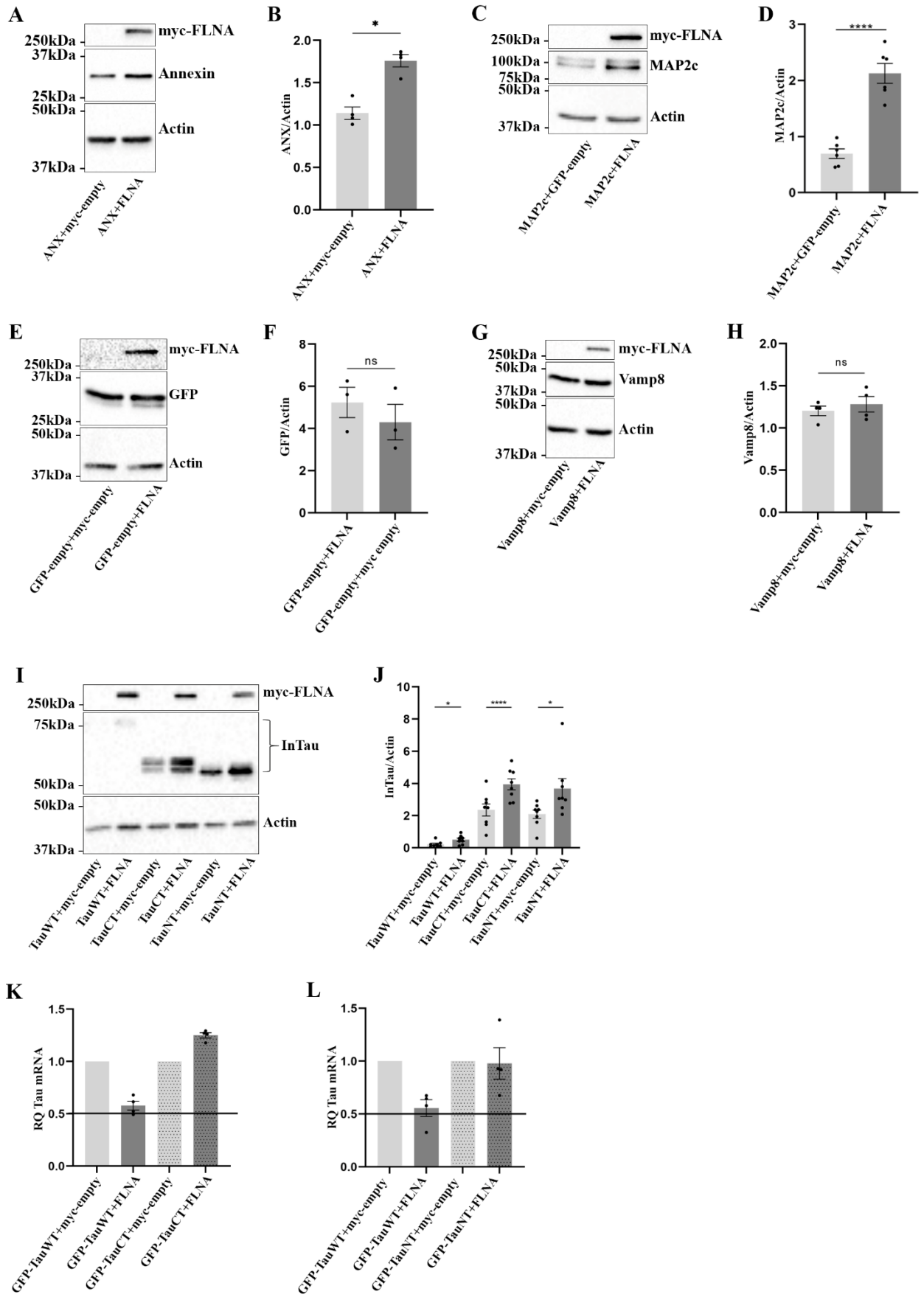


Figure 20. L'interaction avec FLNA est importante pour l'accumulation intracellulaire.

Les cellules N2a ont été co-transfectées avec Annexine II et myc-vide ou Annexine II et myc-FLNA, GFP-MAP2c et myc-vide ou GFP-MAP2c et myc-FLNA, GFP et myc-vide ou GFP et myc-FLNA ainsi que VAMP8 et myc-vide ou VAMP8 et myc-FLNA pendant 48 h. **A, B**, Analyse par Western blot et analyse densitométrique du signal obtenu avec l'anticorps Annexine II, n=4. **C, D**, Analyse par Western blot et analyse densitométrique du signal MAP2c, n=6. **E, F**, Analyse par Western blot et analyse densitométrique du signal obtenu avec l'anticorps GFP, n=3. **G, H**, Analyse par Western blot et analyse densitométrique du signal VAMP8, n=4. **I**, Les cellules N2a ont été co-transfectées en présence ou absence de FLNA avec TauWT ou TauCT ou TauNT pendant 48h. myc-vide a été utilisé comme témoin. L'analyse par Western blot du signal GFP a montré une augmentation intracellulaire de Tau lors de la surexpression de FLNA indépendamment du domaine ciblé. **J**, L'analyse densitométrique a montré que cette augmentation était significative, n=7. Le signal de Tau a été normalisé sur celui de l'actine et l'anticorps c-myc a été utilisé pour confirmer la transfection de FLNA. Les résultats ont été représentés en nuage de points \pm S.E.M où chaque point représente un n. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$. **K, L**, Les cellules N2a ont été co-transfectées soit avec GFP-TauWT et GFP-vide ou GFP-TauWT et myc-FLNA ou GFP-TauCT et GFP-vide ou GFP-TauCT et myc-FLNA ainsi que GFP-TauNT et GFP-vide ou GFP-TauNT et myc-FLNA pendant 48 h. L'expression des ARNm a été mesurée en quantité relative (RQ). Le RQ correspond au « cycle seuil » et a été calculé comparativement à une condition calibrateur, soit TauWT et GFP-vide. Le calibrateur a un RQ de 1. Le RQ est considéré comme significatif lorsque $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$. Les résultats de l'analyse RTqPCR ont été représentés sous forme d'un nuage de points \pm S.E.M où chaque point représente un n. La surexpression de FLNA n'a pas modifié les niveaux de Tau.

3.6 La surexpression de FLNA augmente le niveau de Tau phosphorylée et de sa forme clivée par la caspase-3, mais pas le niveau de Tau ubiquitinylée.

Dans les tauopathies, l'accumulation et l'auto-agrégation de Tau corrèlent avec son niveau d'hyperphosphorylation. Nous avons étudié l'effet de la surexpression de FLNA sur la phosphorylation de Tau. Pour ce faire, des cellules N2a ont été co-transfectées avec Flag-Tau4R et GFP-vidé ainsi que Flag-Tau4R et myc-FLNA. Quatre anticorps dirigés contre la Tau phosphorylée ont été utilisés et leurs signaux ont été normalisés sur Tau intracellulaire totale (InTau). L'analyse densitométrique effectuée avec l'anticorps Tau-1, qui reconnaît Tau déphosphorylée au niveau de l'épitope 195-202, n'a montré aucune différence significative entre Tau exprimée seule et Tau en présence de FLNA (**Figure 21.A-B**). L'anticorps S199-202, qui reconnaît les sérines 199 et 202, et AT180, ciblant les résidus T231/S235, ont montré une augmentation significative par Western blot contrairement à l'anticorps T205, spécifique à la thréonine 205. (**Figure 21.A, C-E**).

De plus, il a été montré que l'interaction de FLNA avec plusieurs protéines est régulée par sa phosphorylation au site S2152 (van der Flier, A. et Sonnener, A., 2001). Sachant que FLNA augmente également la forme phosphorylée de Tau, nous avons étudié si l'interaction avec Tau pouvait influencer le niveau de phosphorylation de FLNA. L'anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de FLNA sur le résidu S2152 montre que la phosphorylation n'a pas été affectée par la surexpression de Tau (**Figure 21.F-G**).

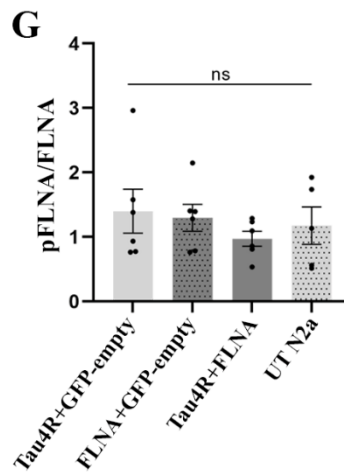
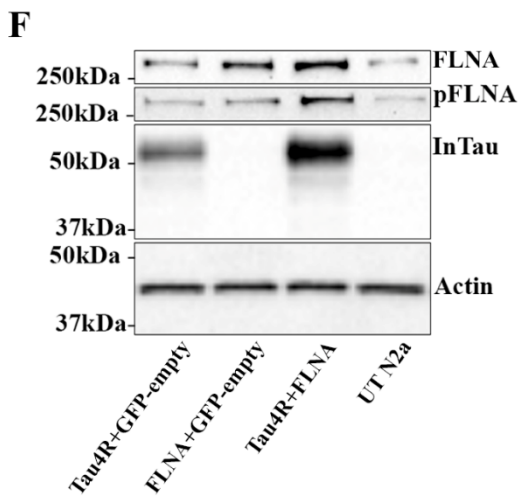
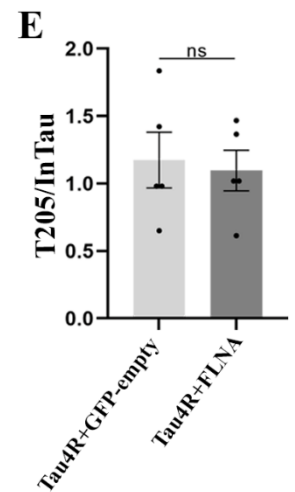
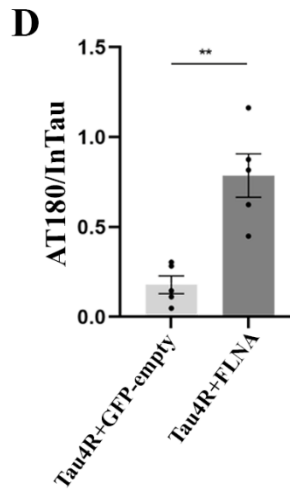
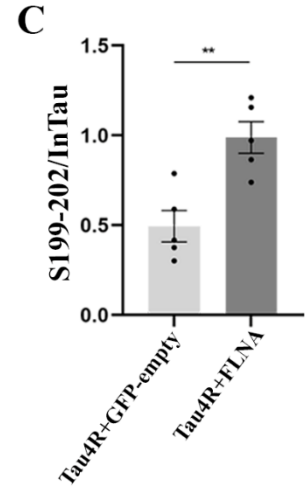
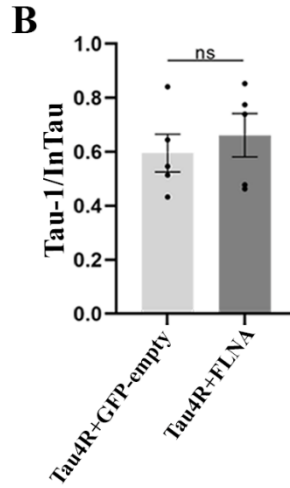
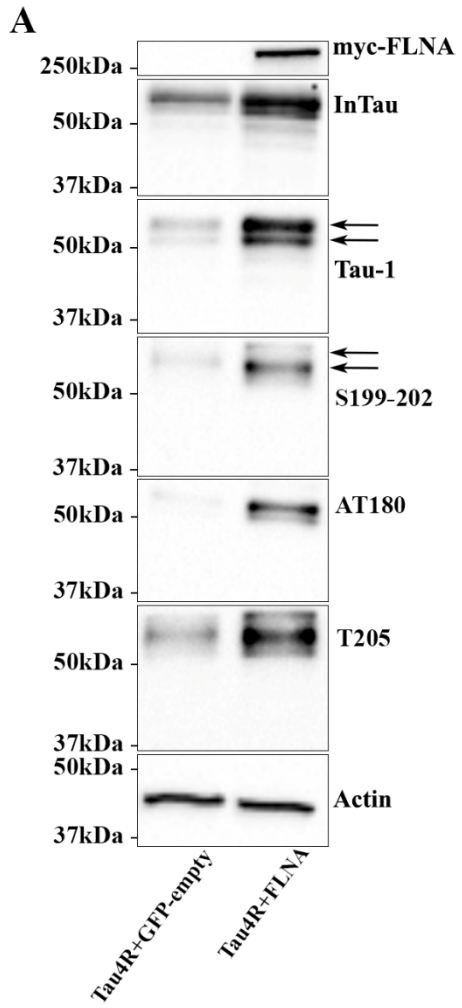


Figure 21. La surexpression de FLNA augmente l'accumulation intracellulaire de la Tau phosphorylée. Les cellules N2a ont été co-transfectées avec Flag-Tau4R et myc-FLNA ou Flag-Tau4R et GFP-vidé pendant 48h. **A**, Analyse par Western blot du lysat cellulaire avec les anticorps A0024, Tau-1, S199-202, AT180 et T205, n=5. **B-E**, Analyses densitométriques du signal de chacun des anticorps sur InTau, n=5. **F**, Les cellules N2a ont été co-transfectées avec Flag-Tau4R avec ou sans FLNA ainsi qu'avec myc-FLNA seule pendant 48h. Des cellules non transfectées (UT N2a) ont été utilisées comme témoins. Analyse par Western blot du lysat cellulaire avec l'anticorps détectant la FLNA phosphorylée (pFLNA) et un anticorps détectant la FLNA totale. **G**, L'analyse densitométrique du signal pFLNA normalisé sur FLNA totale n'a montré aucune différence significative entre les conditions, n=6. Les résultats représentent un nuage de points où chaque point représente un n. L'anticorps A0024 (InTau) ainsi que les anticorps Tau-1, S199-202, AT180 et T205 ont été utilisés et la protéine actine a été utilisée pour les normalisations. L'anticorps c-myc a été utilisé pour confirmer la transfection de FLNA. Les résultats ont été représentés par un nuage de points \pm S.E.M où chaque point représente un n. **, $p < 0.01$.

Nous avons également examiné si la surexpression de FLNA affectait d'autres PTMs dont le clivage par la caspase-3 ainsi que l'ubiquitination. Tout d'abord, nous avons étudié le niveau de Tau clivée par la caspase-3 (Tau-C3) dans les cellules N2a co-transfectées avec Flag-Tau4R et GFP-vidé ainsi que Flag-Tau4R et myc-FLNA. Le signal de l'anticorps Tau-C3, normalisé sur Tau intracellulaire totale, a montré une augmentation significative de l'accumulation intracellulaire de Tau-C3 lors de la surexpression de FLNA (Figure 22.A-B).

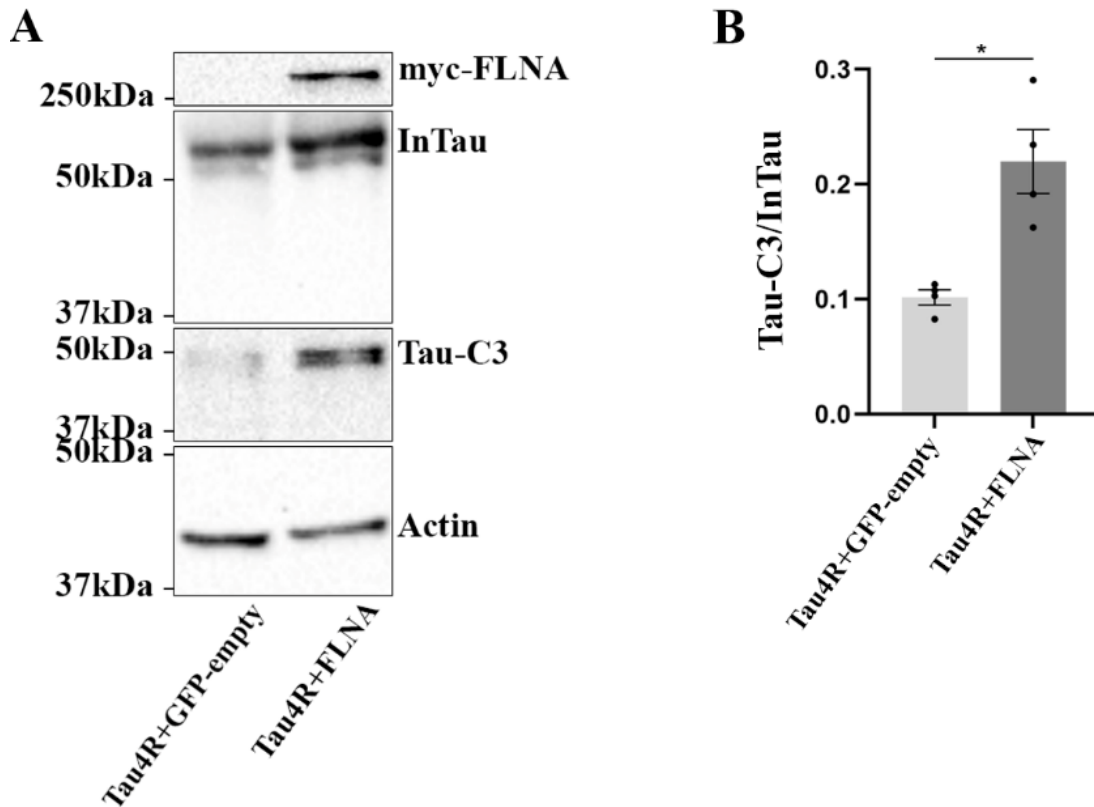


Figure 22 : La surexpression de FLNA augmente l'accumulation intracellulaire de la forme Tau clivée par la caspase-3. Les cellules N2a ont été co-transfectées soit avec Flag-Tau4R et GFP-vidé ou Tau4R et myc-FLNA pendant 48h. **A**, L'analyse Western blot du lysat cellulaire avec l'anticorps reconnaissant la Tau clivé par la caspase-3 (Tau-C3). **B**, L'analyse densitométrique du signal Tau-C3, n=3. Le signal de Tau-C3 a été normalisé sur le signal InTau. Les résultats ont été représentés en nuage de points \pm S.E.M où chaque point représente un n. *, $p < 0.05$.

L'ubiquitination est une PTM très importante pour le processus de dégradation par le protéasome et l'autophagie. Des études ont montré que FLNA peut compétitionner aux sites d'ubiquitination d'une protéine causant l'inhibition de la dégradation de la protéine. Puisque Tau possède quelques sites d'ubiquitination dans le domaine N-terminal et dans le domaine MBRs nous avons co-transfecté des cellules N2a avec GFP-TauCT et myc-vidé ou GFP-TauCT et myc-FLNA ainsi que GFP-TauNT et myc-vidé ou GFP-TauNT et myc-FLNA. Les protéines ubiquitinylées ont été immunoprécipitées avec la technologie Ubiquitine-Trap. L'analyse avec l'anticorps A0024 (InTau) de la fraction protéine totale (Input) a confirmé l'augmentation de Tau intracellulaire dans les conditions en surexpression de FLNA. Pour ce qui est de l'élution, l'anticorps A0024 a montré une augmentation du signal Tau intracellulaire totale à 50 kDa ainsi que du signal de Tau ubiquitinylées situé entre 75-100 kDa dans les conditions en surexpression de FLNA. Pour finir, l'analyse par Western blot avec l'anticorps ubiquitine totale montre que le niveau d'ubiquitine était inchangé entre la condition vide et la condition en surexpression de FLNA de GFP-TauCT et GFP-TauNT (**Figure 23.A**). Cela suggère que FLNA ne compétitionne pas avec les sites d'ubiquitination et n'altère pas l'ubiquitination et la désubiquitination de Tau. En conclusion, une réduction du niveau d'ubiquitination de Tau qui aurait eu des effets négatifs sur sa dégradation ne peut pas expliquer son accumulation intracellulaire lors de la surexpression.

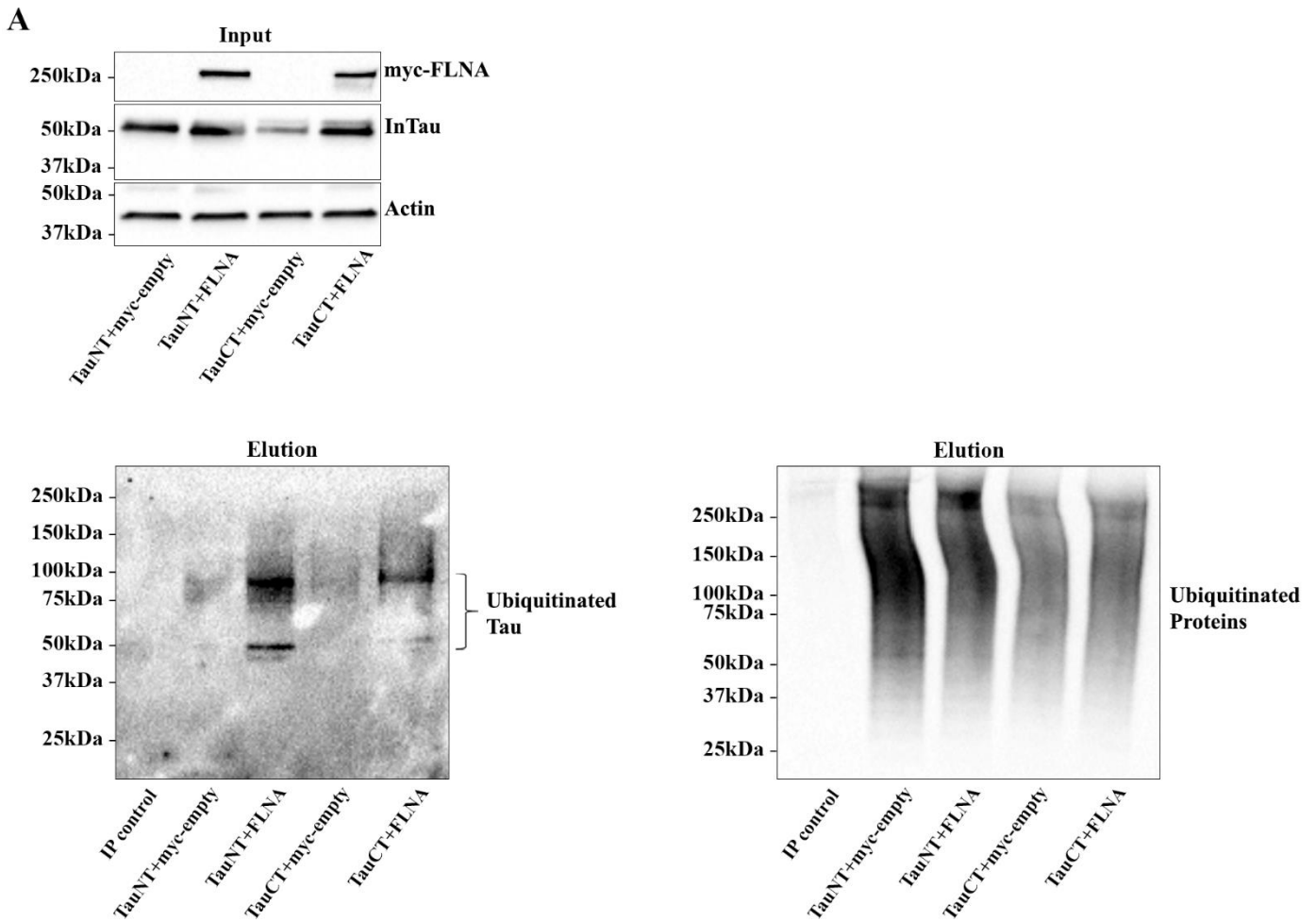


Figure 23. La surexpression de FLNA n'affecte pas l'ubiquitination de Tau. Les cellules N2a ont été co-transfectées avec GFP-TauCT et myc-vide ou GFP-TauCT et myc-FLNA ainsi que GFP-TauNT et myc-vide ou GFP-TauNT et myc-FLNA pendant 48h. La technologie ubiquitine-Trap a été utilisée pour immunoprécipiter les protéines ubiquitinylées. **A**, L'analyse par Western blot avec l'anticorps A0024 des fractions Input et élution a montré une augmentation de Tau intracellulaire totale à 50 kDa (InTau) dans les conditions en surexpression de FLNA. L'analyse de l'élution avec l'anticorps A0024 a révélé aussi une augmentation du signal Tau ubiquitinylée retrouvé entre 75-100 kDa dans les conditions

en surexpression de FLNA. L'élution avec l'anticorps ubiquitine a montré que le niveau de protéines ubiquitinylées était inchangé lorsque FLNA est surexprimée.

Pour finir, le niveau d'agrégation de Tau joue un rôle majeur dans l'interaction avec d'autres protéines, dans le dysfonctionnement de voies de signalisation et dans la dégénérescence de la MA. Nous avons donc étudié si la surexpression de FLNA affectait le niveau d'agrégation de Tau. Pour ce faire, des cellules N2a ont été co-transfectées avec Flag-Tau et GFP-vidé ainsi que Flag-Tau et FLNA. L'analyse du niveau d'agrégats de Tau par HTRF n'a pas révélée la présence d'agrégats de Tau dans nos échantillons (résultats non inclus).

3.7 L'accumulation de Tau affecte la stabilité des microtubules.

Les modifications post-traductionnelles ainsi que l'interaction avec d'autres protéines peuvent diminuer l'interaction de Tau avec les microtubules ce qui cause la déstabilisation de ces derniers. Sachant que FLNA interagit avec Tau et que la surexpression de FLNA cause une accumulation intracellulaire de Tau sauvage, phosphorylée et clivée, nous avons voulu étudier si l'accumulation de Tau affectait la stabilité des microtubules. Pour ce faire, nous avons mesuré le niveau de tubuline acétylée de cellules N2a co-transfectées soit avec Flag-Tau4R et myc-vidé soit avec Flag-Tau4R et myc-FLNA. L'analyse par Western blot a montré une augmentation de la tubuline acétylée en surexpression de FLNA (**Figure 24.A**). L'analyse densitométrique a montré une augmentation significative du ratio tubuline acétylée sur tubuline totale dans la condition Flag-Tau4R et myc-vidé comparativement aux cellules non transfectées ainsi qu'une augmentation significative encore plus prononcée entre les conditions Flag-Tau4R et myc-FLNA et les cellules non transfectées (**Figure 24.B**).

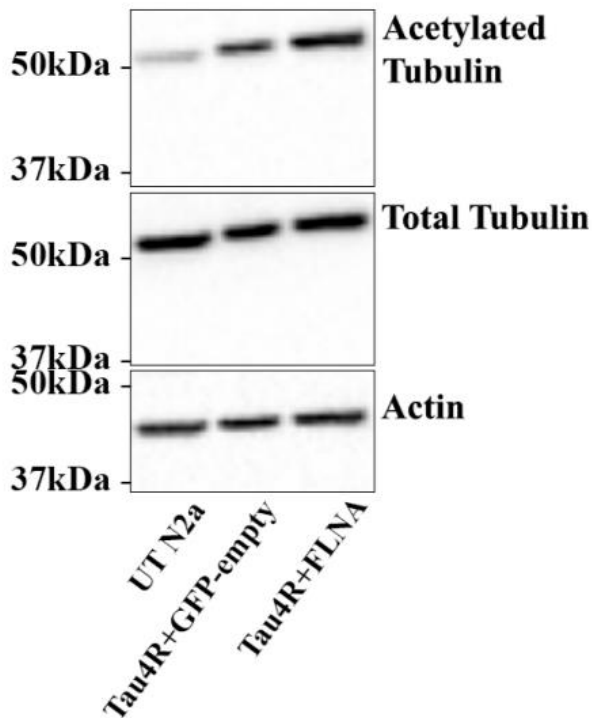
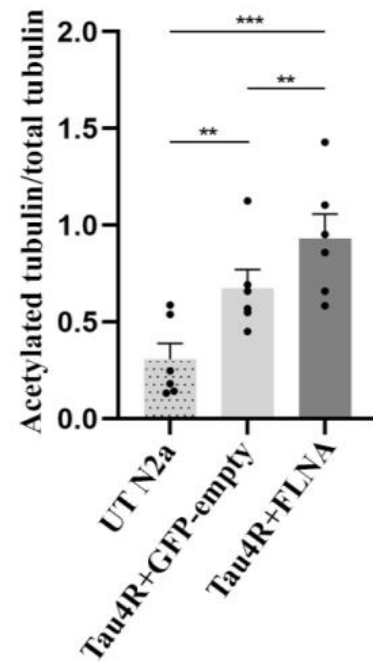
A**B**

Figure 24. Augmentation de la tubuline acétylée lors de la surexpression de FLNA. Les cellules N2a ont été co-transfectées avec Tau4R et myc-vide ou Tau4R et myc-FLNA pendant 48h. Des cellules non transfectées (UT N2a) ont été utilisées comme témoins. **A**, Analyse par Western blot du lysat cellulaire avec l'anticorps détectant la tubuline acétylée et la tubuline totale. L'actine a été utilisée comme témoins de chargement et l'anticorps c-myc a été utilisé pour confirmer la transfection de FLNA. **B**, L'analyse densitométrique du signal tubuline acétylée normalisé sur le signal tubuline total a montré une augmentation significative entre les conditions, n=6. Les résultats ont été représentés avec un nuage de points où chaque point représente un n. **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

3.8 La surexpression de FLNA augmente l'accumulation intracellulaire des formes de Tau mutées.

Des mutations de Tau sont liées aux FTLD-Tau. Les trois mutations les plus souvent retrouvées dans ces tauopathies sont TauP301L, TauV337M et TauR406W. Pour étudier l'effet de FLNA sur les formes mutées de Tau, les cellules N2a ont été co-transfectées avec TauP301L, TauV337M et TauR406W en absence ou en présence de FLNA. Les analyses densitométriques montraient une accumulation significative avec les trois mutants lors de la surexpression de FLNA (**Figure 25.A-F**). Ces résultats indiquent que l'interaction de Tau avec FLNA n'implique pas ces acides aminés et que l'accumulation intracellulaire de Tau, lors de la surexpression de FLNA, pourrait être présente dans toutes les tauopathies.

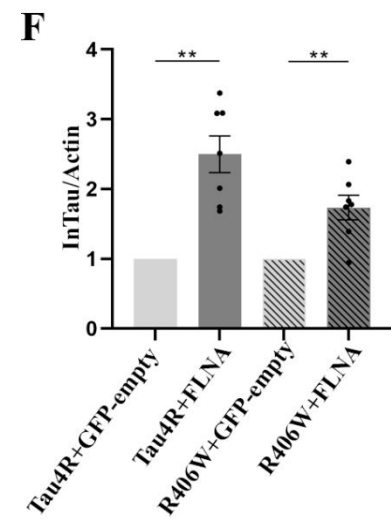
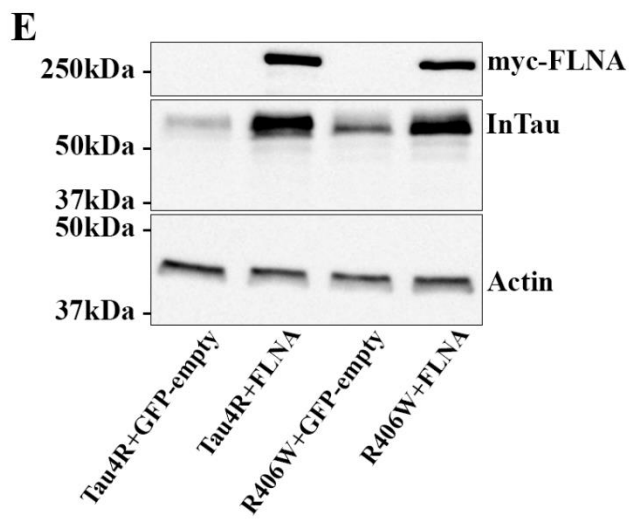
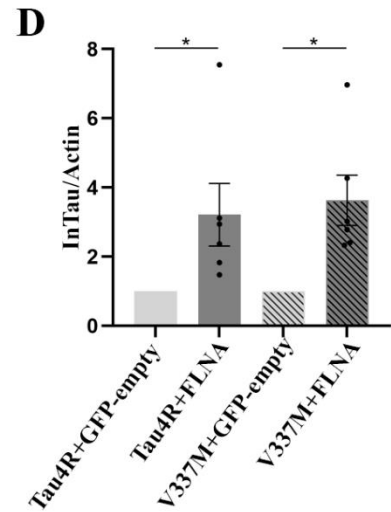
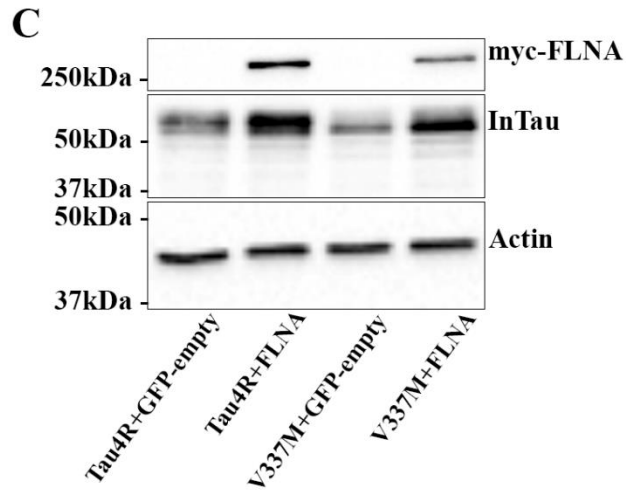
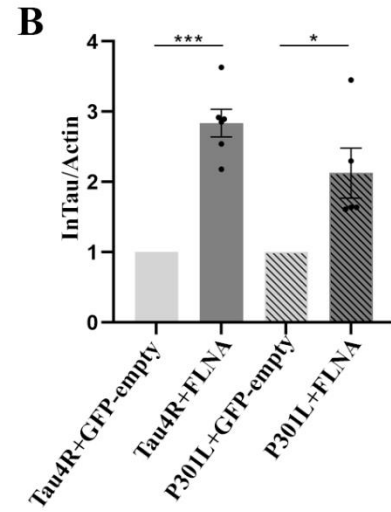
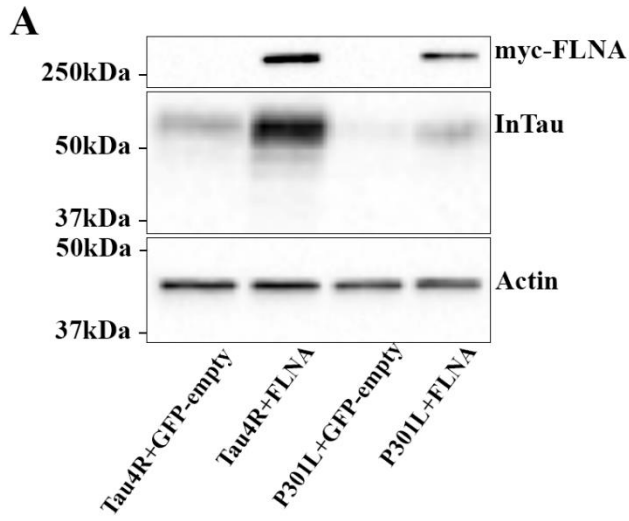


Figure 25. Accumulation intracellulaire de Tau mutées lors de la surexpression de FLNA.

Les cellules N2a ont été co-transfectées avec Tau4R, P301L, V337M ou R406W et FLNA pendant 48h. GFP-vidé a été utilisé comme témoin. **A, C, E**, Analyses par Western blot du signal InTau de P301L, n=5; V337M, n=6 et R406W, n=7. **B, D, F** Analyses densitométriques du signal InTau de P301L, V337M et R406W respectivement. Le signal InTau a été normalisé sur le signal de l'actine. L'anticorps c-myc a été utilisé pour confirmer la transfection de FLNA. Les conditions GFP-vidé ont été rapportées à 1 pour une meilleure représentation. Les résultats ont été représenté en nuage de points \pm S.E.M où chaque point représente un n. *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Chapitre 4: Discussion

4.1 Résumé des résultats

Dans cette étude, nous avons rapporté une augmentation de la filamine A insoluble (iFLNA) dans des échantillons de cerveaux MA. L'effet de l'augmentation de FLNA sur Tau a été étudié dans la lignée cellulaire de neuroblastome de souris (N2a). L'isolation de Tau par immunoprécipitation GFP-Trap a montré que la région 215-441 a.a. de Tau et FLNA co-immunoprécipitaient. Cette co-immunoprécipitation a été confirmée par l'isolation de FLNA par immunoprécipitation Myc-Trap. La surexpression de FLNA a produit une augmentation de Tau^{0N3R} et Tau^{0N4R} intracellulaire indiquant que l'accumulation était indépendante de l'isoforme de Tau. L'augmentation intracellulaire observée lors de la surexpression de FLNA n'avait pas été causée par l'augmentation de l'expression génique de Tau, mais par son accumulation protéique. De plus, des co-transfections de FLNA avec différentes protéines (Annexine A2, MAP2c, GFP et VAMP8) ont montré que l'interaction avec FLNA jouait un rôle dans l'accumulation intracellulaire. Cependant des co-transfections avec les plasmides Tau C-terminal (GFP-TauMBD-CT) et Tau N-terminal (GFP-TauNT) avec ou sans FLNA ont révélé une accumulation lors de la surexpression de FLNA. Ces résultats nous montrent que l'interaction n'est pas uniquement médiée entre les a.a. 215-441 de Tau. La surexpression de FLNA a montré aussi une augmentation de certains sites de phosphorylation de Tau, soient S199-202 et T231/S235. Cependant, la phosphorylation de FLNA était restée inchangée autant avec Flag-Tau^{0N4R} seul, myc-FLNA seul ou Flag-Tau^{0N4R} et myc-FLNA. De plus, la surexpression de FLNA a augmenté l'accumulation intracellulaire de Tau clivée par la caspase-3 (Tau-C3). Des immunoprécipitations des protéines ubiquitinylées par la technologie Ubiquitin-Trap ont montré que la surexpression de FLNA n'empêchait pas l'ubiquitinylation de Tau. L'accumulation de Tau par la surexpression de FLNA a causé aussi une augmentation du ratio tubuline acétylée/tubuline totale indiquant une augmentation de la stabilisation des microtubules. Pour finir, la surexpression de FLNA a

produit aussi une accumulation intracellulaire des Tau mutées P301L, V337M et R406W indiquant que cette accumulation serait présente dans d'autres tauopathies. Collectivement, les observations ci-dessus montrent que la surexpression de FLNA pourrait jouer un rôle important dans l'accumulation de Tau dans la MA. Empêcher cette interaction pourrait réduire l'accumulation de Tau ainsi que ses effets néfastes sur les neurones.

4.2 Augmentation de filamine A insoluble dans l'Alzheimer

Dans la littérature, une analyse protéomique par LC/MS-MS de cerveaux MA montre que les NFTs interagissent et capturent plus de 155 protéines. Ces protéines viennent de différents processus, telles que la signalisation, le cytosquelette, le transport intracellulaire, la réponse au stress ou les métabolismes énergétiques et chaperonnes (Wang, Q., 2005; Yu, A., 2019; Zhang, Q., 2018; Li, K.W., 2019). La iFLNA a été retrouvée dans les NFTs lorsque ces derniers ont été isolés de cerveaux MA par MS. Haenig C. et al. ont présenté un réseau d'interaction montrant une augmentation du niveau de iFLNA et de iTau ainsi qu'une augmentation de leurs agrégations dans les cerveaux MA (Haenig, C. et al, 2020). Dans notre étude, nous avons quantifié le niveau protéique d'iFLNA dans des échantillons du cortex antérieur pariétal post mortem de 60 individus. Selon la classification ABC score, nos résultats montrent une augmentation significative d'iFLNA dans le groupe MA comparativement aux témoins.

4.3 L'interaction de FLNA est médiée par un domaine qui se trouve dans la région 215-441 a.a. de Tau.

Une immunoprécipitation de Tau par GFP-Trap ainsi qu'une immunoprécipitation de FLNA par Myc-Trap ont montré que FLNA et GFP-TauMBD-CT, ayant les a.a 215 à 441, co-immunoprécipitaient. Ces résultats nous indiquent que FLNA interagit avec un domaine présent dans la région 215-441 a.a. de Tau. La littérature révèle que la Tau possède plus de 60 partenaires de liaison. Une revue de la littérature montre que l'interaction peut être médiée par plusieurs régions de Tau, soit par le N-terminal ou par la PRR ou par les MBRs (Trushina, N.I., 2019). Cependant, très peu d'interaction ont été identifiées au niveau du C-terminal de Tau. Dans la MA, plusieurs protéines ont été répertoriées pour interagir avec Tau, tels que l'A β , la phosphatase 2A et la 14-3-3 (Trushina, N.I., 2019). Nos résultats suggèrent que l'interaction avec FLNA est médiée par un domaine situé dans la région 215-441 a.a. de Tau. Des techniques plus poussées pourraient être utilisées pour confirmer l'interaction de FLNA avec Tau, telles que la résonance plasmon de surface (SPR) et le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET). Cependant ceux-ci requièrent certaines connaissances sur l'interaction entre les deux protéines étudiées. Cependant une technique plus simple appelée BioID, actuellement effectuée dans le laboratoire, permettrait de confirmer l'interaction de FLNA avec Tau. Celle-ci permet d'étudier les interactions protéine-protéine *in vivo* par l'utilisation de BirA*, un mutant de la biotine ligase BirA de procaryote d'*Escherichia coli* (*E.coli*). La protéine BirA* fusionnée à la protéine d'intérêt cause la biotinylation des protéines endogènes interagissant avec la protéine d'intérêt. La fusion de BirA* avec la protéine d'intérêt ainsi que la présence de Biotine produit la biotinylation des protéines endogènes interagissant avec la protéine d'intérêt. Les protéines biotinylées peuvent ensuite être isolées par immunoprécipitation et identifiées par spectrométrie de masse. Cette technique permettrait d'étudier la présence d'interactions faibles ou transitoires qui ne sont normalement pas détectées par les co-immunoprécipitations.

4.4 La surexpression de FLNA augmente l'accumulation intracellulaire de Tau sauvage et mutée.

Dans le cerveau humain, la protéine Tau possède 6 isoformes : 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R et 2N4R (Goedert, M. et al., 1989). Nos résultats montraient que la surexpression de FLNA augmentait l'accumulation intracellulaire de Tau4R et de Tau3R après 48h de transfection dans les lysats des cellules N2a. Cette accumulation montre que l'interaction de FLNA avec Tau est indépendante de l'isoforme. Ces résultats suggèrent aussi que l'interaction de FLNA n'est pas médiée par les inserts en N-terminal ni par le deuxième domaine MBR de Tau. De plus, plusieurs études sur l'agrégation de Tau ont permis de classer les tauopathies en trois classes basées sur la prédominance des isoformes trouvées dans les agrégats de Tau : 1) les agrégats composés majoritairement d'isoforme 4R retrouvés dans la CBD et dans la PSP, 2) les agrégats composés majoritairement d'isoformes 3R retrouvés dans la maladie de Pick, 3) les agrégats composés d'un mixte d'isoformes 3R et 4R (Buée, L. et Delacourte, A., 1999; Ferrer, I. et al., 2014; Munoz, D.G., 2003; Delacourte, A. et al., 1998). Espinoza et al. ont montré, lors d'une étude biochimique dans l'hippocampe et le cortex de cerveaux MA, la présence des isoformes 3R et 4R dans les agrégats de iTau (Espinoza, M. et al., 2010). De plus, ils ont montré que le ratio des isoformes 3R et 4R dans les agrégats variait selon la sévérité de la maladie. En effet, ils ont observé une répartition égale des isoformes 3R et 4R dans certains cas comparativement à une augmentation de l'isoforme 4R dans les cas sévères de la maladie. Pour finir, Espinoza et al. ont aussi montré que les cellules N2a expriment un niveau similaire des isoformes 3R et 4R lors d'une double transfection (Espinoza, M. et al., 2010). En prenant en considération ces informations ainsi que nos résultats, nous pouvons conclure que l'accumulation intracellulaire de Tau par la surexpression de FLNA sera retrouvée dans toutes les tauopathies.

De plus, la MA est la seule tauopathie n'ayant pas de mutation dans le gène *MAPT*. Des co-transfections de Tau mutées, soit TauP301L, TauR406W et TauV337M, ont montré

une accumulation intracellulaire de la Tau dans les cellules N2a lors de la surexpression de FLNA. Selon la littérature, ces trois mutations sont les plus retrouvées dans les tauopathies, dont principalement dans la FTLD-Tau, le deuxième type de démence le plus répandu. La mutation P301L est située dans la deuxième répétition du domaine MBR qui est uniquement trouvée dans les isoformes 4R (Dujardin, S., et al., 2020). Une étude sur des souris transgéniques exprimant la protéine Tau humaine P301L a montré une tendance à la hausse de son auto-assemblage qui est dépendante de l'âge (Ramsden, M. et al., 2005). Dans les modèles animaux, la mutation P301L est caractérisée comme ayant une agrégation agressive de Tau pour la formation des NFTs (Cosacak, M.I. et al., 2017). La mutation V337M est située dans la quatrième répétition du domaine MBR trouvée dans les isoformes 3R et 4R (Dujardin, S., et al., 2020). Ce mutant accélère aussi l'agrégation de Tau en NFTs, mais de façon moins agressive que le mutant P301L (Nacharaju, P., et al., 1999). La mutation V337M est aussi plus sensible à la phosphorylation (del C. Alonso, A. et al., 2004). Pour ce qui est de la mutation R406W, celle-ci est située dans le C-terminal et est trouvée dans toutes les isoformes de Tau (Dujardin, S., et al., 2020). Des études sur des patients et des souris rapportent une FTLD-Tau avec un phénotype semblable à la MA lorsque le mutant R406W est présent. De plus, cette protéine mutée a été rapportée comme étant moins phosphorylée mais beaucoup plus clivée par la calpaïne produisant des fragments de Tau (Dayanandan, R., et al., 1999; Matsumura, N. et al., 1999; Delobel, P. et al, 2002). En prenant en considération nos résultats obtenus avec les mutants, l'accumulation de ces derniers dans les cellules N2a, lors de la surexpression de FLNA, indique fortement que ces mutants peuvent interagir avec FLNA et que le domaine d'interaction de Tau n'implique pas les acides aminés mutés dans ces mutants.

Aucunes études n'ont rapporté la présence de mutations de FLNA dans la MA. Les mutations induisant des gains ou des pertes de fonctions de FLNA sont retrouvées dans plusieurs filaminopathies, comme la dysplasie fronto-métaphysaire, l'OPD de type 1 et l'OPD de type 2 ainsi que le syndrome de Melnick-Needles et l'hétérotopie

périvericulaire (Robertson, S.P., 2007; Lange, M., 2015). De plus, une étude a montré que l'altération au niveau de la conformation de FLNA favorise l'activation des kinases causant l'hyperphosphorylation de Tau *via* la signalisation d'A β 42 au récepteur α 7nAChR. Il serait donc possible que certaines mutations de FLNA puissent affecter directement la protéine Tau. Des analyses par séquençage à lecture longue pourraient être effectuées pour identifier la présence ou non de FLNA mutée chez des patients MA et témoins. Ce test peut être effectué sur des échantillons sanguins et permet d'identifier des gènes ayant des activités augmentées ou diminuées ainsi que des polymorphismes nucléotidiques et des épissages alternatifs de l'ARN (Trevino, V. et al., 2007).

4.5 Surexpression de FLNA n'affecte pas l'expression génique de Tau

Nos résultats ont montré que la surexpression de FLNA causait une accumulation intracellulaire de Tau suggérant que l'interaction de FLNA avec Tau induit son accumulation. Cependant cette accumulation pourrait aussi être causée par l'augmentation de l'expression génique de Tau. De plus, FLNA, une fois clivée par la calpaïne au niveau du domaine H2, produit un fragment de 90 kDa. Ce fragment peut se déplacer vers le noyau cellulaire pour effectuer plusieurs rôles dont la réparation de l'ADN et l'activation de plusieurs facteurs de transcription, comme l'ARN polymérase I, Smad, FOXC1, HIF1 α et MKL1 (Sasaki, A et al., 2001; Abrass, C.K. et Hansen, K.M., 2010; Muehlich, S. et al., 2016; Yue, J. et al., 2010). Il est donc possible que FLNA augmente l'expression génique de Tau. L'analyse du niveau d'ARNm de Tau des cellules co-transfectées avec GFP-TauWT en absence ou présence de FLNA n'a montré aucun changement significatif dans l'expression génique de Tau. Cependant, l'analyse du niveau d'ARNm de Tau de cellules co-transfectées avec Flag-Tau4R en absence ou en présence de FLNA a révélé une augmentation significative de l'expression génique de Tau lors de la surexpression de FLNA. Bien que ces deux résultats de Tau exogène soient contradictoires, nous avons pensé que Tau pourrait avoir des amplificateurs dans les

exons (eExons). Les eExons existent tout au long de la séquence du génome et jouent un rôle important dans la régulation de la transcription chez les mammifères (Hirsch, N. et Birnbaum, R.Y., 2015). Une étude a montré que la régulation de la transcription de l' α -synucléine était régulée par l'interaction de la kinase de type polo 2 (PLK-2) avec un eExon présent dans l' α -synucléine. L'interaction de PLK-2 avec l' α -synucléine inhibait la transcription de cette dernière (Kofoed, R.H et al., 2017). Nous nous sommes donc interrogés sur la possibilité d'une régulation à la hausse de l'expression de Tau *via* l'interaction de FLNA avec un eExon présent dans Tau. Puisque les résultats de Tau exogènes variaient entre les deux expériences, nous avons étudié le niveau protéique de Tau endogène en absence ou en présence d'une surexpression de FLNA. S'il y a la présence d'eExons, alors nous observerions une augmentation de Tau endogène lors de la surexpression de FLNA. Nos résultats ne montraient aucun changement significatif dans le niveau protéique de Tau endogène suggérant que Tau ne possède pas d'eExons interagissant avec FLNA et que la surexpression de FLNA n'affecte pas l'expression génique de Tau. Les résultats obtenus avec la construction Flag-Tau4R seraient probablement liés au vecteur d'expression.

4.6 L'interaction avec FLNA est importante pour l'accumulation intracellulaire.

En milieu physiologique l'interaction de FLNA avec plusieurs protéines est importante dans plusieurs voies de signalisation. Cependant, il a aussi été démontré que l'interaction de FLNA avec certaines protéines peut engendrer des dysfonctionnements des voies de signalisation. Nous avons voulu étudier si l'interaction avec FLNA était obligatoire pour obtenir une accumulation intracellulaire. Pour ce faire, quatre protéines, soit Annexine A2, MAP2c, GFP et VAMP8, ont été co-transfectées en absence ou en présence de FLNA. L'Annexine A2 (ANX II) est une protéine jouant un rôle important dans la motilité cellulaire et dans l'ancrage de complexe protéique membranaire au cytosquelette d'actine. Dans les neurones, l'ANX II est retrouvée en grande quantité au niveau des cônes de croissance et des branches axonales (Zhao, W.Q. and Lu, B., 2007). Une étude protéomique de l'ANX II a aussi montré que FLNA fait partie de son interactome (Zhou, S et al., 2012). Nos résultats ont montré une augmentation intracellulaire de l'ANX II lors de la surexpression de FLNA. Ce résultat suggère que l'interaction de FLNA avec ANX II favorise son accumulation. De plus, une étude a montré que l'ANX II interagit avec le N-terminal de Tau et jouerait un rôle important dans l'enrichissement de Tau dans les axones ainsi que dans la redistribution de Tau en milieu pathologique (Gauthier-Keper, A. et al., 2018). Il serait possible que la surexpression de FLNA affecte l'interaction de ANX II avec Tau ce qui impacterait le niveau de Tau dans les axones. Des lysats de cellules N2a co-transfectées avec TauWT ou TauMBD-CT ou TauNT en absence ou en présence de FLNA pourraient être immunoprécipités pour observer si une co-immunoprécipitation de l'ANX II par la Tau serait modulée ou non par la surexpression de FLNA.

De plus, la co-transfection de FLNA et MAP2c, une protéine faisant partie des MAPs et qui est retrouvée uniquement chez les mammifères, a montré une accumulation intracellulaire de cette dernière en surexpression de FLNA. Des études ont montré que la

région de liaison aux microtubules de Tau partage 80% d'homologie avec celui de MAP2c (Dehmelt, L. et Halpain, S., 2005). En considérant nos résultats obtenus lors des immunoprécipitations, il est fort possible que l'interaction de FLNA avec Tau soit située dans la région de liaison aux microtubules hautement conservée de la famille des MAPs. D'autant plus, nous pourrions supposer que l'accumulation de MAP2c par la surexpression de FLNA joue un certain rôle dans la MA. MAP2 est principalement retrouvée au niveau du corps cellulaire des neurones ainsi que dans les dendrites et joue aussi un rôle dans la stabilisation des microtubules. Des analyses ultrastructurales ont montré sa présence le long des microtubules. Zhang et Dong ont montré qu'un dysfonctionnement de MAP2 entraînait une déstabilisation des microtubules causant une altération du transport axonal qui favorise l'apoptose dans les neurones (Zhang, J. et Dong, X.P., 2012). De plus, Xie et al. ont étudié la localisation de MAP2 dans des cerveaux Alzheimer et ont trouvé que MAP2 ne co-localisait pas avec les NFTs (Xie, C. et al., 2014). Roseblatt et al. ont aussi montré l'absence de MAP2 dans les NFTs (Roseblatt, M. et al., 1989). Une analyse par immunoblot confirme la présence de Tau et l'absence de MAP2 dans la fraction Sarkosyl-insoluble de cerveaux MA (Xie, C. et al., 2014). De plus, Xie et al. ont montré par microscope à force atomique que, lors de l'agrégation, Tau formait des fibres tandis que MAP2 formait des granules. Les granules de MAP2 induisaient une neurotoxicité similaire à celle de Tau, mais sa structure granulaire empêchait la co-localisation dans les NFTs (Xie, C. et al., 2015). Même si Tau et MAP2 partagent une homologie élevée, leur destin dans l'Alzheimer diffère dû à leurs formes agrégées. Ces informations révèlent que les MAPs jouent un rôle important dans la MA. Cependant, Tau semble avoir un effet beaucoup plus important dans la MA dû à sa forme d'agrégation.

Nos résultats de l'ANX II et MAP2c indiquent que l'interaction de FLNA induit l'accumulation intracellulaire de la protéine étudiée. Cependant pour confirmer cette hypothèse, l'étude du niveau protéique intracellulaire des protéines n'interagissant pas avec FLNA doit être effectuée. VAMP8, une R-SNARE qui se trouve au niveau des endosomes tardifs et jouant un rôle important dans l'exocytose, ainsi que la GFP ont été

utilisées pour observer l'accumulation intracellulaire des protéines n'interagissant pas avec FLNA (Pilliod, J. et al., 2020). Les co-transfections de VAMP8 et GFP avec ou sans FLNA ont montré aucun changement significatif dans les niveaux protéiques. Ces résultats indiquent que l'interaction avec FLNA est primordiale pour observer une accumulation intracellulaire.

Sachant que l'interaction avec FLNA est importante pour l'accumulation intracellulaire et que cette interaction semble être au niveau des domaines MBRs, nous avons voulu observer la présence et l'absence d'accumulation intracellulaire avec les plasmides GFP-TauMBD-CT et GFP-TauNT. À notre grande surprise, nos résultats ont montré une accumulation intracellulaire de GFP-TauMBD-CT et de GFP-TauNT en surexpression de FLNA. Une étude protéomique a montré que certaines protéines peuvent se lier sur plusieurs domaines de Tau, telles que la protéine 14-3-3, l'héparine, la PP2A et les protéines prions qui interagissent avec les domaines N-Terminal, PRR et MBRs de Tau (Trushina, N.I., 2019). Il est donc possible que FLNA puisse interagir avec plusieurs domaines de Tau. L'absence de co-immunoprécipitation entre le GFP-TauNT et FLNA, dans nos résultats précédents, pourrait être due à la présence d'une interaction de faible affinité. De nombreux processus biologiques critiques dans les voies de signalisation sont médiées par des interactions faibles ou transitoires. Il a été montré que ces interactions ont tendance à se dissocier pendant les lavages, échappant ainsi à la détection lors de la co-immunoprécipitation (Berry, S.M. et al., 2014). L'utilisation du *Label transfer* permettrait de détecter la présence d'interactions faibles ou transitoires dans nos conditions et confirmerait si FLNA peut interagir avec plus d'un domaine de Tau.

4.7 La surexpression de FLNA cause une accumulation de certaines formes de Tau phosphorylée et de sa forme clivée par la caspase-3, mais pas de Tau ubiquitinylée et agrégée.

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus retrouvée chez Tau. Elle joue un rôle important dans la régulation du dynamisme des microtubules. Dans la MA, 45 sites de phosphorylation, majoritairement dans la région riche en proline et dans les domaines aux microtubules, ont été identifiés comme des sites importants dans la maladie (Noble, W. et al., 2013). Les 5 sites de phosphorylation les plus connus dans la MA ont été étudiés en surexpression de FLNA dans les N2a, soit S199-202, T205, T231 et S235 (Hanger, D.P. et Noble, W., 2011). Nos résultats ont montré une accumulation de Tau phosphorylée aux sites S199-202 (pS199-pS202) ainsi que T231 (pT231) et S235 (pS235), mais pas au site T205 (pT205). Des études ont montré une accumulation élevée de Tau pS199 et pS202 dans le compartiment somatodendritique comparativement à la pT205 qui est retrouvée en plus grande quantité dans les axones (Binder, L.I. et al., 1985; Hernandez, F. et al., 2003). De plus, Barthélemy et al. ont montré, par LC-MS, une différence des niveaux de phosphorylation présente dans le liquide cébrospinal (LCS) et le cerveau d'un même patient atteint de la MA. Par exemple, les niveaux de pS199 et pS202 dans le LCS sont beaucoup plus faibles que dans le cerveau comparativement à pT205 qui est retrouvé en grande quantité dans le LCS et non pas dans le cerveau (Barthélemy, N.R. et al., 2020). Cela suggère que pS199 et pS202 favorisent la séquestration de Tau dans les neurones et que pT205 favorise la sécrétion de Tau. Nos résultats corrént avec ces observations, puisque la phosphorylation des sites S199-202 était significativement augmentée comparativement à T205 qui ne montrait aucune différence significative dans les lysats des cellules N2a. Nos résultats ont montré aussi une augmentation de pT231 et pS235 lors de la surexpression de FLNA. Hanger et Noble ont montré que la phosphorylation des sites T231 et S235 sont souvent retrouvées dans la MA (Hanger, D.P. et Noble, W., 2011). De plus, Dujardin et al. montraient que la phosphorylation de ces sites corrélait avec la progression clinique de l'Alzheimer ainsi que l'accumulation intracellulaire de Tau dans les cellules HEK293 (Dujardin, S. et al., 2020).

Cependant, Li et al. ont observé que la phosphorylation de T231 était plus efficace lorsque le site S235 est phosphorylé. Par contre, la phosphorylation de T231 n'était pas nécessairement couplée à la phosphorylation de S235 (Li, T. et al., 2006). Pour finir, l'anticorps Tau-1, ciblant la Tau déphosphorylée, n'a montré aucune différence significative dans l'accumulation intracellulaire lors de la surexpression de FLNA. Ces résultats montrent que la surexpression de FLNA induit une accumulation de certaines Tau phosphorylées dont la Tau phosphorylée aux sites S199-202, T231 et S235 qui jouent un rôle important dans la MA.

La phosphorylation est aussi la principale modification post-traductionnelle régulant les fonctions de FLNA. La phosphorylation de FLNA est régulée par plusieurs kinases dont la protéine kinase ribosomal S6, la protéine kinase C, la kinase p21 activé, la protéine kinase dépendante de l'AMPc ainsi que la protéine kinase Ca²⁺ dépendante de la calmoduline II (Woo, M.S. et al., 2004; Tigges, U. et al., 2003; Vadlamudi, R.K. et al., 2002; Jay, D. et al., 2004). La phosphorylation de FLNA prévient son clivage par la calpaïne et peut aussi affecter son interaction avec ses partenaires de liaison (van der Flier, A. et Sonnenberg, A., 2001; Chen, M., et Stracher, A., 1989). L'anticorps ciblant le site S2152, le principal site de phosphorylation de FLNA, n'a révélé aucune différence significative lors de plusieurs transfections, soit Flag-Tau0N4R ou Myc-FLNA ou Flag-Tau0N4R et myc-FLNA dans les lysats de cellules N2a. Cela suggère que sa surexpression en présence de Tau ne favorise pas sa phosphorylation.

Plusieurs études ont montré que le clivage protéolytique de Tau ainsi que la dégradation de Tau hyperphosphorylée dans la MA sont altérées. Premièrement, il a été démontré que l'augmentation de l'activité de la caspase-3 corrèle avec la formation des NFTs et que la co-localisation de Tau-C3 dans les NFTs corrèle avec la perte cognitive dans la MA (de Calignon, A. et al., 2010; Su, J.H. et al., 2001; Basurto-Islas, G. et al., 2008). Le clivage par la caspase-3 favorise la production de fragments toxiques, cependant elle

favorise aussi la dégradation par l'autophagie (Addrienne, S. et al., 2013). Dans notre étude, nous montrons une accumulation intracellulaire de Tau-C3 lors de la surexpression de FLNA. Ce résultat suggère que l'interaction de Tau avec FLNA favorise l'activité de la caspase-3. Sachant que Tau-C3 est plus facilement agrégée, il est possible que la vitesse de production de Tau-C3 soit plus rapide que la vitesse de dégradation de l'autophagie. Par conséquent, l'agrégation de Tau-C3 serait favorisée. Des analyses par Western blot et densitométriques du signal LC3-II et p62 de lysats de cellules N2a co-transfectées avec Tau4R et myc-vidé ou Tau4R et FLNA pourraient être effectuées pour étudier si la surexpression de FLNA affecte le flux de l'autophagie (Yoshii, S.R et Mizushima, N., 2017).

La caspase-3 n'est pas la seule protéase altérée dans la MA. En effet, plusieurs études ont montré que la forme active de la calpaïne (calpaïne-2) est retrouvée dans 50-75% des NFTs et que l'augmentation de son activité serait due à l'augmentation du calcium intracellulaire caractéristique des maladies neurodégénératives (Adamec, E. et al., 2011). La calpaïne joue aussi un rôle important dans le clivage de FLNA (Sasaki, A et al., 2001; Abrass, C.K. et Hansen, K.M., 2010). Des analyses de Western blot et densitométriques du signal calpaïne pourrait être effectué avec des lysats de cellules N2a co-transfectées avec Tau4R et myc-vidé ou Tau4R et FLNA pour étudier l'effet de la surexpression de FLNA sur l'activité de la calpaïne. De plus, ces conditions nous permettraient aussi d'étudier si l'interaction de FLNA avec Tau empêche le clivage de FLNA par la présence ou l'absence d'une augmentation du niveau de FLNA clivée.

De plus, des études récentes ont montré que dans la MA la dégradation par l'UPS est altérée. L'UPS est un mécanisme important dans la régulation du niveau protéique et dans l'élimination des protéines mal repliées ou mutées. Cependant dans la MA, une augmentation de l'ubiquitine dans les plaques A β et les NFTs a été retrouvée ainsi qu'une diminution de l'activité du protéasome (Adrienne, S. et al., 2013). Une des régulations de l'ubiquitination est effectuée par le contrôle de l'accessibilité au domaine de liaison de

l'ubiquitine (UBD). Des études ont montré que l'UBD peut interagir avec des protéines autres que l'ubiquitine (Withers-Ward, E.S. et al., 2000; Bertolaet, B.L. et al., 2001). Notre hypothèse est que l'ubiquitination de Tau est inhibée due à son interaction avec FLNA. Pour ce faire, les lysats de cellules N2a co-transfectées avec GFP-TauMBD-CT ou GFP-TauNT en absence ou en présence de FLNA ont été immunoprécipités par la technologie Ubiquitin-Trap. Nos résultats ont montré l'accumulation intracellulaire de Tau lors de la surexpression de FLNA et celle-ci n'empêchait pas l'ubiquitinylation de Tau. De plus, le niveau des protéines ubiquitinylées totales restait inchangé entre la condition Tau seule et Tau en présence de FLNA. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre FLNA et Tau n'altère pas le système d'ubiquitination de Tau. Cependant, il est possible que l'altération de l'UPS soit au niveau du protéasome après la déubiquitination de la protéine. Le complexe Tau-FLNA pourrait être trop gros pour pénétrer dans la chambre protéolytique (protéasome 20S) ou l'interaction de FLNA avec Tau pourrait empêcher le clivage dans la chambre protéolytique. Il est aussi probable que l'interaction de FLNA avec Tau empêche la reconnaissance au niveau du protéasome 19S. Une étude récente a montré que l'augmentation de Tau hyperphosphorylée corrélait avec la diminution de l'activité du protéasome 26S (Myeku, N. et al., 2016). De plus, une étude a montré que le protéasome 20S co-précipitait avec les agrégats de Tau (Keck, S. and al., 2003). Des co-immunoprécipitations du protéasome par Tau pourraient être effectuée avec des lysats de cellules N2a co-transfectées avec Flag-Tau4R et myc-vidé ou Flag-Tau4R et myc-FLNA. L'anticorps protéasome 26S ou autres anticorps ciblant les composantes du protéasome, dont les anticorps ciblant le protéasome 19S et le protéasome 20S, permettraient d'observer si Tau interagit avec le protéasome en présence de FLNA (Myeku, N. et al., 2016).

Les protéines à longue durée de vie, les grosses protéines ainsi que les agrégats sont majoritairement dégradés par l'autophagie. Ceux-ci sont séquestrés dans les autophagosomes, des vésicules à double membranes, qui fusionnent avec les lysosomes ce qui permet la dégradation. De plus, il a été montré que l'activité du protéasome et de

l'autophagie sont reliées. En effet, lorsqu'il y a une diminution de l'activité du protéasome, des protéines chaperonnes vont mener les protéines ubiquitinylées à l'autophagie pour être dégradées. Les protéines chaperonnes les plus connues menant à l'autophagie sont Hsp70, Hsp90, BAG3 et LAMP-2A (Koopman, M. and Rüdiger, S.G.D., 2020). Des co-immunoprécipitations pourraient être effectuées avec des lysats de cellules N2a co-transfectées avec Flag-Tau4R et myc-vidé ou Flag-Tau4R et myc-FLNA pour observer si les protéines chaperonnes co-précipitent avec Tau lors de la surexpression de FLNA. Cependant, une altération de l'autophagie entraîne une diminution de l'activité du protéasome (Lilienbaum, A, 2013). Plusieurs études ont montré la présence d'une altération de l'autophagie dans la MA par l'augmentation des vacuoles autophagiques (Iqbal, K. et al., 2010; Park, S. et al., 2018; Chesser, A.S. et al., 2013). En plus d'étudier le flux de l'autophagie comme mentionné plus haut, l'utilisation de drogues inhibant l'autophagie, comme la chloroquine, et activant l'autophagie, tel que la Rapamycin, pourraient être utilisées. Ces expériences permettraient : 1) d'étudier si FLNA est un inhibiteur endogène de la dégradation autophagique et 2) étudier si l'activation de la dégradation par l'autophagie favorise la dégradation du complexe Tau-FLNA.

Pour finir, nos résultats obtenus ci-dessus montrent que la surexpression de FLNA produit une accumulation des Tau sauvages, mutées, phosphorylées et clivées. Cependant ces résultats n'indiquent pas s'il y a une augmentation des agrégats de Tau. Or les agrégats de Tau sont importants pour l'altération des voies de dégradation. Nous avons donc étudié s'il y avait une augmentation du niveau d'agrégats de Tau dans l'accumulation observée lors de la surexpression de FLNA. L'analyse de l'agrégation de Tau par fluorescence homogène en temps résolu (HTRF), un kit reconnaissant les dimères de Tau, n'a révélé aucun agrégat de Tau dans les lysats de cellules N2a co-transfectées avec Flag-Tau4R et GFP-vidé ou Flag-Tau4R et myc-FLNA. Il a été rapporté que les études *in vivo* sur l'agrégation de Tau sont principalement effectuées avec des isoformes de Tau tronquées recombinantes (Lim, S. et al., 2014). Les formes de Tau tronquées ont une vitesse d'agrégation plus rapide et des études ont montré que Tau est anormalement

tronquée sur plusieurs sites dans la MA. En effet, plus de 50 Tau tronquées ont été identifiées, dont 30 sont présentes dans la MA (Quinn, J.P. et al., 2018). Les Tau tronquées aux sites Q391 et D421 ainsi que les fragments 35 kDa, 24 kDa et 17 kDa obtenus par le clivage de la calpaïne sont les plus retrouvés dans la MA (Kovacech, B. et al., 2010; Friedrich, M.G. et al., 2021). Sachant que la vitesse d'agrégation de la protéine Tau pleine longueur est plus lente que les formes de Tau tronquées, il est fort possible que le niveau d'agrégation, après seulement 48h de transfection, soit trop faible pour être détecté par HTRF. N'ayant pas ou peu d'agrégats de Tau dans nos conditions, il est fort possible que les voies de dégradation par l'UPS et par l'autophagie ne soient pas altérées. Pour étudier si la surexpression de FLNA affecte l'agrégation de Tau ainsi que les voies de dégradation par l'UPS et l'autophagie il serait préférable d'utiliser une Tau tronquée au lieu de la Tau pleine longueur. Comme par exemple la Tau-C3, qui est retrouvée en grande quantité dans la MA et qui possède aussi une vitesse d'agrégation rapide. En co-transfectant des cellules N2a avec Tau-C3 et myc-vidé ainsi qu'avec Tau-C3 et myc-FLNA, il serait possible d'analyser la présence d'agrégats de Tau par HTRF et d'étudier l'effet de la surexpression de FLNA sur l'agrégation de Tau. Ces conditions permettront aussi d'étudier l'effet de la surexpression de FLNA sur les voies de dégradation par l'UPS et l'autophagie.

4.8 L'accumulation de Tau par la surexpression de FLNA augmente la stabilisation des microtubules.

La régulation des MTs est majoritairement contrôlée par des PTMs de la tubuline ou par l'interaction des MAPs avec les MTs. L'acétylation de la tubuline est la PTM la plus importante dans la régulation des MTs (Logan, C.M. et Menko, A.S., 2019). Des expériences *in vitro* ont montré que l'acétylation de la tubuline stabilise les MTs en améliorant leur flexibilité par la réduction des interactions inter-protofilaments. En condition physiologique, les MTs acétylés se trouvent enrichis au site proximal et distal de l'axone ainsi que dans les régions présynaptiques dans les neurones matures (Song, Y.

et al., 2015). Cependant, plusieurs études ont montré que le niveau de tubuline totale ainsi que d' α -tubuline étaient significativement réduits dans la MA (Eshun-Wilsona, L. et al., 2019; Zhang, F. et al., 2015). Zhang et al. ont montré que, dans des échantillons de tissus cérébraux humains, le niveau total de tubuline et de tubuline acétylée étaient significativement réduits dans les cerveaux MA (Zhang, F. et al., 2015). Cependant, lorsque la tubuline acétylée a été normalisée sur la tubuline totale, le ratio de la tubuline acétylée était significativement augmenté dans les cerveaux MA comparativement aux cerveaux témoins. L'augmentation du ratio observé dans l'étude de Zhang et al. suggère que la tubuline acétylée serait plus résistante à la dégradation. Cette hypothèse est soutenue par l'observation des régions riches en tubuline acétylée dans les neurones matures étant mieux préservées dans la MA. Nos résultats ont montré une augmentation du ratio tubuline acétylée/tubuline totale en présence de Tau seule comparativement à la condition témoin ainsi qu'une augmentation encore plus significative lors de la surexpression de FLNA. Cependant nous avons observé que la quantité de tubuline totale était inchangée entre les trois conditions. Cela indique que notre augmentation du ratio n'est pas causée par la résistance à la dégradation de la tubuline acétylée comme suggéré dans l'étude de Zhang et al. Dans notre cas, nos résultats montraient que l'augmentation de la tubuline acétylée corrélait avec l'augmentation du niveau de Tau intracellulaire. Balabanian et al. ont montré que Tau était principalement enrichie dans les segments courbés des MTs, puisqu'ils sont moins stables que les segments droits des MTs. Il a été montré que la stabilisation des microtubules par Tau enclenche l'acétylation de l' α -tubuline (Szyk, A., et al., 2014) et que l'acétylation de la tubuline était une protection des MTs contre le vieillissement mécanique (Portan, D. et al., 2017). De plus, ils ont observé que l'enrichissement de Tau inhibait la motilité de la kinésine-1, la protéine motrice dans le transport de cargo sur les MTs, suggérant un déficit dans le transport axonal (Balabanian, L. et al., 2017). Bunker et al. ont aussi montré qu'une surexpression de Tau sauvage 4R ou 3R diminuait le temps alloué pour la croissance des microtubules ce qui réduisait la longueur des MTs. Le taux de croissance des microtubules étant affecté, ceci impact directement la dynamique des MTs. À long terme, la stabilisation des MTs par Tau

et l'acétylation de l' α -tubuline serait donc néfaste pour les neurones (Bunker, J.M. et al., 2004). En considérant les résultats de Balabanian et al. ainsi que Bunker et al., nos résultats suggèrent que l'accumulation de Tau par la surexpression de FLNA favoriserait davantage la protection des MTs par l'acétylation de l' α -tubuline et pourrait enrichir les segments courbés des MTs. De plus, il est possible que notre accumulation intracellulaire de Tau, lors de la surexpression de FLNA, favoriserait aussi l'inhibition de la motilité de la kinésine-1 et une réduction de la croissance des MTs ce qui engendrerait un dysfonctionnement plus important dans le transport axonal. Tout d'abord il serait intéressant d'étudier le niveau de tubuline acétylée dans des cellules N2a transfectées avec FLNA seule. Cela permettrait de comparer le ratio de tubuline acétylée/tubuline totale des conditions UTs, Tau seule, FLNA seul ainsi que Tau et FLNA. De plus, il serait intéressant d'étudier la localisation de Tau sur les MTs. Pour ce faire, des immunofluorescences de neurones d'hippocampe matures de rats sains ainsi que de rats transgéniques R962-hTau pourraient être effectuées. Ce modèle présente les principales caractéristiques des tauopathies humaines, telles que l'augmentation des inclusions de Tau agrégée en fonction de l'âge, la perte neuronale et la neurodégénérescence globale. Cela permettrait de confirmer la localisation de Tau au niveau des régions courbées des MTs. De plus, les neurones de rats R962-hTau pourraient être transfectés avec FLNA pour visualiser et localiser l'interaction Tau-FLNA (Malcolm, J.C and al., 2019). Il serait aussi intéressant d'étudier la polymérisation des MTs entre des conditions témoins, Tau transfectée seule ainsi que Tau co-transfectée avec FLNA. L'imagerie de cellules vivantes, soit par marquage fluorescent des MTs entiers ou des protéines retrouvées uniquement aux extrémités des MTS, pourrait être effectuée pour étudier l'effet de FLNA sur la dynamique des MTs (Gierke, S. and al., 2010).

4.9 Avantages et limitations du modèle cellulaire

Les N2a est un modèle favorable à l'étude de la croissance des neurites, de la neurotoxicité et de la MA. Cette lignée produit une grande quantité de protéines microtubulaires ce qui facilite l'étude des mécanismes tels que le renouvellement, la synthèse et l'assemblage des microtubules ainsi que l'étude de la cinétique de liaison des protéines GTPase. De plus, les neuroblastomes sont plus faciles à manipuler que les neurones ce qui en fait un modèle plutôt attrayant pour l'étude des maladies neurodégénératives et à prions chez l'Homme. Cependant, leur physiologie diffère du contexte physiologique humain ce qui cause une certaine limitation dans l'observation et l'interprétation des résultats dans ce modèle. Les résultats obtenus dans les cellules N2a devront être confirmés dans un modèle plus approprié et proche des conditions physiologiques humaines. La surexpression de FLNA dans des neurones humains serait un meilleur modèle pour étudier l'effet de cette protéine sur Tau.

4.10 Perspectives futures et conclusions

Plus de 50 millions de personnes seraient atteintes de démence dans le monde, dont 60-70% seraient atteintes de la MA. Dans une certaine mesure, les traitements actuels pour la MA peuvent ralentir chez certains individus à un certain stade de la maladie la progression de la MA pendant quelques années. La MA est une maladie multifactorielle causée par une variété de protéopathies, de dysfonctionnements synaptiques, de neuroinflammation ainsi que de la dégénérescence et de l'atrophie. Cependant les facteurs impactant le plus la maladie sont le mauvais repliement de l'A β 42 et l'agrégation de Tau hyperphosphorylée. Dans leur état protéopathique, ces deux protéines peuvent interagir de façon directe ou indirecte avec d'autres protéines pouvant causer une augmentation de leur effet toxique. Des études ont montré que FLNA joue un rôle important dans la voie pathologique A β 42. En effet, une altération de la conformation de FLNA favorise l'hyperphosphorylation de Tau *via* la voie de signalisation d'A β 42. Wang H.Y. et al. ont même montré que l'utilisation de la drogue PTI-125, une petite molécule se liant à FLNA avec une haute affinité, permettait de restaurer la conformation de FLNA et donc de diminuer le niveau d'agrégation de Tau hyperphosphorylée et de l'A β ainsi que de diminuer le dysfonctionnement des récepteurs α 7nAChR, NMDA et de l'insuline. La question sur l'effet de FLNA sur la voie pathologique de Tau peut donc être posée. Notre étude montre une augmentation de l'iFLNA dans les cerveaux MA. Dans notre modèle cellulaire N2a, nous montrons que Tau interagit avec FLNA et que cette interaction est importante pour observer l'accumulation intracellulaire de Tau sauvage, phosphorylée et mutée. L'accumulation de Tau ne provient pas d'une augmentation de l'expression génique, mais du niveau protéique intracellulaire. La surexpression de FLNA produit aussi une accumulation de la Tau-C3, une Tau tronquée importante dans sa dégradation et dans la formation de fragments toxiques. L'accumulation de toutes ces formes de Tau semble indiquer un dysfonctionnement au niveau de l'UPS et de l'autophagie. Malheureusement, ces dysfonctionnements n'ont pas été étudiés dans notre modèle. Cependant, nos résultats suggèrent que la surexpression

de FLNA joue un rôle dans la voie pathologique de Tau. Une étude plus approfondie sur l'interaction de FLNA avec Tau et son impact sur l'UPS et l'autophagie permettrait de mieux comprendre le rôle de FLNA dans la MA. La prévention de cette interaction par l'utilisation d'une drogue pourrait réduire l'accumulation de Tau ainsi que son effet néfaste sur les neurones.

Bibliographies

Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T.C., Cryns, V., Berry, R.W. et Kuret, J. (2000). C-terminal inhibition of tau assembly *in vitro* and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci.* 113(21): 3737-45.

Adamec, E., Mohan, P., Vonsattel, J.P. and Nixon, R.A. (2002). Calpain activation in neurodegenerative diseases: confocal immunofluorescence study with antibodies specifically recognizing the active form of calpain 2. *Acta Neuropathol.* 104: 92–104.

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

Arai, T., Guo, J. P., and McGeer, P. L. (2005). Proteolysis of non-phosphorylated and phosphorylated tau by thrombin. *J. Biol. Chem.* 280(7): 5145–5153.

Arai, T., Ikeda, K., Akiyama, H., Nonaka, T., Hasegawa, M., Ishiguro, K., ..., Muchizuki, A. (2004). Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration. *Ann Neurol.* 55: 72–79.

Arber, C., Lovejoy, C. and Wray, S. (2017). Stem cell models of Alzheimer's disease: progress and challenges. *Alzheimer's Research & Therapy.* 9: 42.

Avila, J., Jimenez, J.S., Sayas, C.L., Bolos, M., Zabala, J.C., Rivas, G., Hernandez, F. (2016). Tau Structures. *Front Aging Neurosci.*8: 262.

Balabanian, L., Berger, C.L. and Hendricks, A.G. (2017). Acetylated microtubules are preferentially bundled leading to enhanced Kinesin-1 motility. 113(7):1551-1560.

Barbier, P., Zejneli, O., Martinho, M., Lasorsa, A., Belle, V., Smet-Nocca, C., ..., Landrieu, I. (2019). Role of tau as a microtubule-associated protein: structural and functional aspects. *Front. Aging Neurosci.* 11: 204.

Barthélemy, N. R., Li, Y., Joseph-Mathurin, N., Gordon, B. A., Hassenstab, J., Benzinger, T. L. S., ..., McDade, E. (2020). A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and

the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 26: 398–407.

Basurto-Islas, G., Luna-Munoz, J., Guillozet-Bongaarts, A.L., Binder, L.I., Mena, R. and Garcia-Sierra, F. (2008). Accumulation of aspartic acid⁴²¹- and glutamic acid³⁹¹-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67: 470–83.

Bednarski, E., and Lynch, G. (1996). Cytosolic proteolysis of tau by cathepsin D in hippocampus following suppression of cathepsins B and L. *J. Neurochem.* 67: 1846–1855.

Behrends, C. and Harper, J.W. (2011). Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nat Struct Mol Biol.* 18: 520–8.

Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science.* 292: 1552–1555.

Berry, S.M., Chin, E.N., Jackson, S.S., Strotman, L.N., Goel, M., Thompson, N.E., ..., Beebe, D.J. (2014). Weak protein-protein interactions revealed by immiscible filtration assisted by surface tension (IFAST). *Anal Biochem.* 447: 133–140.

Bertolaet, B. L., Clarke, D.J., Wolff, M., Watson, M.H., Henze, M., Divita, G. and Redd, S.I. (2001). UBA domains mediate protein–protein interactions between two DNA damage-inducible proteins. *J. Mol. Biol.* 313: 955–963.

Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F.M., Wegiel, J., Yu, W.H. and Nixon, R.A. (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 28: 6926–6937.

Bonda, D.J., Castellani, R.J., Zhu, X., Nunomura, A., Lee, H.G., Perry, G. and Smith, M.A. (2011). A Novel Perspective on Tau in Alzheimer Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 8: 639–642.

Braak, H. and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82(4): 239-59.

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

Bunker, J.M., Wilson, L., Jordan, M.A. and Feinstein, S. (2004). Modulation of microtubule dynamics by Tau in living cells: Implications for development and neurodegeneration. *Mol Biol Cell.* 15(6): 2720–2728.

Camero, S., Benitez, M.J., Cuadros, R., Hernandez, F., Avila, J. and Jimenez, J.S (2014). Thermodynamics of the interaction between Alzheimer’s disease related tau protein and DNA. *PLoS One.* 9(8): e104690.

Canu, N., Dus, L., Barbato, C., Ciotti, M.T., Brancolini, C., Rinaldi, A.M., Novak, M., Cattaneo, A., Bradbury, A., Calissano, P. (1998). Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis *J Neurosci.* 18: 7061–7074.

Centers for Disease Control and Prevention (2017). National Diabetes Statistics Report. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Dept of Health and Human Services.

Chatterjee, S., Peters, S.A., Woodward, M., Mejia Arango, S., Batty, G.D., Beckett, N., ..., Huxley, R.R. (2016). Type 2 diabetes as a risk factor for dementia in women compared with men: A pooled analysis of 2.3 million people comprising more than 100,000 cases of dementia. *Diabetes Care.*; 39(2): 300-7.

Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y.W., Zhong, M., Xu, S.C., Chen, C.H., Li, L., Yu, Z.P. (2012). Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF *Neurochem Int.* 60: 233–242.

Chesser, A.S., Pritchard, S.M. and Johnson, G.V.W. (2013). Tau clearance mechanisms and their possible role in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Frontier in Neurology.*4: 122.

Chin, S.S. et Goldman, J.E. (1996). Glial inclusions in CNS degenerative diseases, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 499–508.

Cho, J.H. et Johnson, G.V (2004). Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J. Neurochem.* 88(2): 349-358.

Chung, C.W., Song, Y.H., Kim, I.K., Yoon, W.J., Ryu, B.R., Jo, D.G., ..., Jung, Y.K. (2001). Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol Dis.* 8: 162–72.

Cohen, T.J., Constance, B.H., Hwang, A.W., James, M., Yuan, C.X. (2016). Intrinsic tau acetylation is coupled to auto-proteolytic tau fragmentation. *PLoS One.* 11(7): e0158470.

Cook C, Stankowski JN, Carlomagno Y, Stetler C, Petrucelli L. (2014). Acetylation: a new key to unlock tau's role in neurodegeneration. *Alzheimer's Res Ther.* 6 (3): 29.

Cosacak, M.I., Bhattarai, P., Bocova, L., Dzewas, T., Mashkaryan, V., Papadimitriou, C., ..., Kizil, C. (2017). Human TAUP301L overexpression results in TAU hyperphosphorylation without neurofibrillary tangles in adult zebrafish brain. *SCientifiC REPOrTs.* 7 (1): 12959.

de Calignon, A., Fox, L.M., Pitstick, R., Carlson, G.A., Bacskai, B.J., Spires-Jones, T.L., ..., Hyman, B.T. (2010). Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature.* 464(7292): 1201–1204.

de Rojas, I., Moreno-Grau, S., Tesi, N., Grenier-Boley, B., Andrade, V., Jansen, I.E., ..., Ruiz, A. (2021). Common variants in Alzheimer's disease and risk stratification by polygenic risk scores. *Nature communications.* 12(1): 3417.

Dehmelt, L. and Halpain, S. (2004). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology.* 6:204.

Didonna, A. (2020). Tau at the interface between neurodegeneration and neuroinflammation. *Genes & Immunity.* 21(5): 288–300.

Dorval, V. and Fraser, P.E. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and α -synuclein. *J Biol Chem.* 281:9919–9924.

Drummond, E., Pires, G., MacMurray, C., Askenazi, M., Nayak, S., Bourdon, M., Safar, J., Ueberheide, B. et Wisniewski, T. (2020). Phosphorylated tau interactome in the human Alzheimer's disease brain. *Brain*. 143(9): 2803-2817.

Drummond, E. and Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's Disease: Experimental Models and Reality. *Acta Neuropathol*. 133(2): 155–175.

Eshun-Wilson, L., Zhang, R., Portran, D., Nachury, M.V., Tosoe, D.B., Löhrf, T., ..., Nogales, E. (2019). Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *PNAS*. 116(21): 10366–10371.

Falcon, B., Zhang, W., Schweighauser, M., Murzin, A.G., Vidal, R., Garringer, H.J., Ghetti, B., Scheres, S.H.W. and Goedert, M. (2018). Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta Neuropathologica*. 136(5): 699–708.

Fernandez-Nogales, M., Santos-Galindo, M., Merchan-Rubira, J., Hoozemans, J.J., Rabano, A., Ferrer, I., Avila, J., Hernandez, F., Lucas, J.J. (2016). Tau-positive nuclear indentations in P301S tauopathy mice. *Brain Pathol*. 27(3): 314-322.

Ferrer, I., Gomez-Isla, T., Puig, B., Freixes, M., Ribe, E. et Dalfo, E. (2005). Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. 2:3–18.

Feuillette, S., Miguel, L., Frébourg, T., Campion, D. and Lecourtois, M. (2010). Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *J. Neurochem*. 113: 895–903.

Filipcik, P., Novak, P., Mravec, B., Ondicova, K., Krajciová, G., Novak, M. et Kvetnansky, R. (2012). Tau protein phosphorylation in diverse brain areas of normal and CRH deficient mice: Up-regulation by stress. *Cell. Mol. Neurobiol*. 32: 837–845.

Fitzpatrick, A.W.P., Falcon, B., He, S., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., ..., Scheres, S.H.W. (2017). Cryo-EM structures of Tau filaments from Alzheimer's disease brain. *Nature*. 547(7662): 185–190 .

Fox, L.M., William, C.M., Adamowicz, D.H., Pitstick, R., Carlson, G.A., Spires-Jones, T.L. and Hyman, B.T. (2011). Soluble tau species, not neurofibrillary aggregates, disrupt neural system integration in a tau transgenic model. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70: 588–595.

Friedrich, M.G., Skora, A., Hancock, S.E., Mitchell, T.W. Else, P.L. and Truscott, R.J.W. (2021). Tau is truncated in five regions of the normal adult human brain. *Int. J. Mol. Sci.* 22(7): 3521.

Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Türk, A., Hoyer, S., Zöchling, R., Boissl, K.W., Jellinger, K. et Riederer, P. (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 105(4-5): 423-38.

Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J. and Feany, M.B. (2014). Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nat Neurosci.* 17:357–366.

Gamblin, T.C., Berry, R.W., Binder, L.I. (2003). Tau polymerization: role of the amino terminus. *Biochemistry.* 42(7): 2252-7.

Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., ..., Cryns V.L. (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100(17): 10032–10037.

Garg, S., Timm, T., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. and Wang, Y. (2011). Cleavage of tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment. *Neurobiol Aging.* 32: 1–14.

Gauthier-Kemper, A., Alonso, M.S., Sündermann, F., Niewidok, B., Fernandez, M.P., Bakota, L., ..., Brandt, R. (2018). Annexins A2 and A6 interact with the extreme N terminus

of tau and thereby contribute to tau's axonal localization. *J. Biol. Chem.* 293(21): 8065–8076.

Gauthier-Kemper, A., Weissmann, C., Golovyashkina, N., SeboLemke, Z., Drewes, G., Gerke, V., Heinisch, J.J., Brandt, R. (2011). The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner. *J Cell Biol.* 192:647–661.

Gendron, T. F. and Petrucelli, L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* 4(13): 1–19.

Gierke, S., Kumar, P. and Wittmann, T. (2010). Analysis of microtubule polymerization dynamics in live cells. *Methods Cell Biol.* 97: 15–33.

Goedert, M. and Jakes, R. (2005). Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 1739: 240–250.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 3(4): 519–526.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., Crowther, R.A. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8: 393–399.

Gong, C.X., Lidsky, T., Wegiel, J., Zuck, L., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 275: 5535–5544.

Gotz, J. (2001). Tau and transgenic animal models. *Brain Research Reviews.* 35: 266–286.

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

Gu, J., Xu, W., Jin, N., Li, L., Zhou, Y., Chu, D., Gong, C.X., Iqbal, K., Liu, F. (2020). Truncation of Tau selectively facilitates its pathological activities. *JBC*. 295(40): 13812–13828.

Guo, T., Noble, W. and Hanger, D.P (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol*. 133: 665–704.

Gushcha, V.K., Lelevich, S.V. et Sheibak, V.M. (2019). Neurotransmitter disturbances in some parts of the rat brain and their correction under chronic and intermittent alcohol intoxication. *Biomed Khim*. 65(1): 21-27.

Hall, G.F. and Yao, J. (2005). Modeling tauopathy: a range of complementary approaches. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1739(2-3): 224–239.

Hammoud, N., Jimenez-Shahed, J. (2019). Chronic neurologic effects of alcohol. *Clin Liver Dis*. 23(1): 141-155.

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

Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P., Anderton, B.H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett*. 147: 58–62.

Hickey, C.M., Wilson, N.R. and Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13: 755–766.

Hinrichs, M.H., Jalal, A., Brenner, B., Mandelkow, E., Kumar, S. and Scholz, T. (2012). Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and α -synuclein. *J Biol Chem*. 287: 38559–38568.

Hirsch, N. and Birnbaum, R.Y. (2015). Dual function of DNA sequences: protein-coding sequences function as transcriptional enhancers. *Perspectives in biology and medicine*. 58(2): 182-195.

Hoffman, J.L., Faccidomo, S., Kim, M., Taylor, S.M., Agoglia, A.E., May, A.M., Smith, E.N., Wong, L.C. et Hodge, C.W. (2019). Alcohol drinking exacerbates neural and behavioral pathology in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol.* 148: 169-230.

Horowitz, P.M., Patterson, K.R., Guillozet-Bongaarts, A.L., Reynolds, M.R., Carroll, C.A., Weintraub, S.T., Bennett, D.A., Cryns, V.L., Berry, R.W., Binder, L.I. (2004). Early N-Terminal changes and Caspase-6 cleavage of Tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 24: 7895–7902.

Huang, D., Yu, M., Yang, S., Lou, D., Zhou, W., Zheng, L., ... Song, W. (2017). Ethanol alters APP Processing and aggravates Alzheimer-associated phenotypes. *Molecular Neurobiology.* 55(6): 5006–5018.

Huseby, C.J., Hoffman, C.N., Cooper, G.L., Cocuron, J.C., Alonso, A.P., Thomas SN, Yang, A.J. and Kuret, J. (2019). Quantification of tau protein lysine methylation in aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 71: 979–991.

Igaz, L.M., Kwong, L.K., Chen-Plotkin, A., Winton, M.J., Unger, T.L., Xu, Y., Neumann, M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y. (2009). Expression of TDP-43 C-terminal fragments *in vitro* recapitulates pathological features of TDP-43 proteinopathies. *J Biol Chem.* 284: 8516–8524.

Ikeda, F. and Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. “Protein modifications: beyond the usual suspects” Review series. *EMBO Rep.* 9: 536–42.

Ingelson, M., Vanmechelen, E. et Lannfelt, L. (1996). Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci. Lett.* 220: 9–12.

Iqbal, K., Liu, C.X. and Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 7(8): 656–664.

Irwin DJ, Cohen TJ, Grossman M, Arnold SE, McCarty-Wood E, Van Deerlin VM, Lee VMY, Trojanowski JQ (2013). Acetylated Tau Neuropathology in Sporadic and Hereditary Tauopathies. *Am J Pathol.* 183: 344–351.

Jacobsen, J.P., Siesser, W.B., Sachs, B.D., Peterson, S., Cools, M.J., Setola, V., Folgering, J.H., Flik, G. et Caron, M.G. (2012). Deficient serotonin neurotransmission and depression-like serotonin biomarker alterations in tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) loss-of-function mice. *Mol Psychiatry.* 17(7): 694-704.

James P. Quinn, Nicola J. Corbett, Katherine A. B. Kellett and Nigel M. Hooper (2018). Tau Proteolysis in the Pathogenesis of Tauopathies: Neurotoxic Fragments and Novel Biomarkers. *Journal of Alzheimer's Disease.* 63: 13–33.

Jay, D., Garcia, E.J., and de la Luz Ibarra, M. (2004). *In situ* determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin. *Mol. Cell. Biochem.* 260: 49-53.

Jeganathan, S., von Bergen, M., Brutlach, H., Steinhoff, H.J. et Mandelkow, E. (2006). Global Hairpin Folding of Tau in Solution. *Biochemistry.* 45: 2283–2293.

Ji, C., Tang, M., Zeidler, C., Höhfeld, J., Johnson, G.V.W. (2019). BAG3 and SYNPO (synaptopodin) facilitate phospho-MAPT/Tau degradation *via* autophagy in neuronal processes. *Autophagy.* 15: 1199–213.

Johnson, G. V., Jope, R. S., and Binder, L. I. (1989). Proteolysis of tau by calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 1505–1511.

Kadavath, H., Cabrales Fontela, Y., Jaremko, M., Jaremko, L., Overkamp, K., Biernat, J., ..., Zweckstetter, M. (2018). The binding mode of a tau peptide with tubulin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57: 3246–3250.

Kappelle, L. et Biessels, G. (2005). Increased risk of Alzheimer's disease in type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem Soc Trans.* 33: 1041.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51: 6304–6311.

Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., Ullrich, O.J. (2003). Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurochem.* 85(1): 115-22.

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

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

Koechling, T., Lim, F., Hernandez, F. and Avila, J. (2010). Neuronal Models for Studying Tau Pathology. *International Journal of Alzheimer's Disease.* 2010: 528474.

Kofoed, R.H., Zheng, J., Ferreira, N., Lykke-Andersen, S., Salvi, M, Betzer, C., ..., Jensen, P.H. (2017). Polo-like kinase 2 modulates α -synuclein protein levels by regulating its mRNA production. *Neurobiology of Disease.* 106: 49–62.

Koga, H. and Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 43: 29-37.

Kontaxi, C., Piccardo, P. and Gill, A.C. (2017). Lysine-directed post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. *Front Mol Biosci.* 4: 56.

Konzack, S., Thies, E., Marx, A., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (2007). Swimming against the Tide: Mobility of the Microtubule-Associated Protein Tau in Neurons. *J Neurosci.* 27: 9916–9927.

Koopman, M.B. and Rüdiger, S.G.D (2020). Alzheimer Cells on Their Way to Derailment Show Selective Changes in Protein Quality Control Network. *Front. Mol. Biosci.* 7: 214.

Kosik, K., Joachim, C. and Selkoe, D. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 4044–4048.

Kosik, K., Orecchio, L., Binder, L., Trojanowski, J., Lee, V. and Lee, G. (1988). Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron*. 1: 817–825.

Kovacech, B. and Novak, M. (2010). Tau Truncation is a Productive Posttranslation Modification of Neurofibrillary Degeneration in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res*. 7: 708–716.

Kovacs, G. G. (2020). Astroglia and tau: new perspectives. *Front. Aging Neurosci*. 12: 96.

Kuhla B., Haase C., Flach K., Lüth H.-J., Arendt T. and Münch G. (2007). Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipidperoxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J. Biol. Chem*. 282: 6984–6991.

Kvetnansky, R., Novak, P., Vargovic, P., Lejavova, K., Horvathova, L., Ondicova, K., Manz, G., Filipcik, P., Novak, M., Mravec, B. (2016). Exaggerated phosphorylation of brain tau protein in CRH KO mice exposed to repeated immobilization stress. *Stress*. 19: 395–405.

Lange, M., Kasper, B., Bohring, A., Rutsch, F., Kluger, G., Hoffjan, S., Spranger, S., ..., Ute Hehr. (2015). 47 patients with FLNA associated periventricular nodular heterotopia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 10: 134.

Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Guerrero-Muoz, M.J., Jackson, G.R. and Kaye, R. (2010). Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry*. 49: 10039–10041.

Launer, L.J., Ross, G.W., Petrovitch, H., Masaki, K., Foley, D., White, L.R. et Havlik, R.J. (2000). Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol Aging*. 21(1): 49-55.

Lee, G., Neve, R.L. and Kosik, K.S. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*. 2(6): 1615–1624.

Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussiere, T., Dupire, M.J., Delacourte, A., Michalski, J.C., Caillet-Boudin, M.L. (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*. 1619: 167–176.

Lester, E., Ooi, F.K., Bakkar, N., Ayers, J., Woerman, A.L., Wheeler, J., Bowser, R., Carlson, G.A., Prusiner, S.B. and Parker, R. (2021). Tau aggregates are RNA-protein assemblies that mislocalize multiple nuclear speckle components. *Neuron*, 109: 1675–1691.

Lewis, T.L. Jr., Courchet, J. and Polleux, F.J. (2013). Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *Cell Biol*. 202(6): 837-48.

Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., ..., Hutton, M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*. 25: 402–405.

Li, K. W., Ganz, A.B. and Smit, A.B. (2018). Proteomics of neurodegenerative diseases: analysis of human post-mortem brain. *J neurochemistry*. 151: 435-445.

Li, Q. and Sun, M. (2017) The role of autophagy in Alzheimer's disease. *J Syst Integr Neurosci*. 3(4): 1-6.

Liang, D., Han, G., Feng, X., Sun, J., Duan, Y and Lei, H. (2012). Concerted perturbation observed in a hub network in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 7(7): e40498.

Lilienbaum, A. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol*. 4(1): 1–26.

Lim, S., Hague, M., Kim, D. Kim, D.J. and Kim, Y.K. (2014). Cell-based models to investigate tau aggregation. *Comput Struct Biotechnol J*. 12(20-21): 7–13.

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

Liu, M.C., Kobeissy, F., Zheng, W., Zhang, Z., Hayes, R.L. and Wang, K.K. (2011). Dual vulnerability of tau to calpains and caspase-3 proteolysis under neurotoxic and neurodegenerative conditions. *ASN Neuro.* 3(1): e00051.

Livesey, M.R., Magnani, D., Hardingham, G.E., Chandran, S., Wyllie, D.J. (2016). Functional properties of in vitro excitatory cortical neurons derived from human pluripotent stem cells. *J Physiol.* 594(22): 6573-6582.

Loeffler, D.A. (2021). Modifiable, non-modifiable, and clinical factors associated with progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* 80(1): 1–27.

Logan, C.M. and Menko, A.S. (2019). Microtubules: Evolving roles and critical cellular interactions. *Exp Biol Med (Maywood).* 244(15): 1240–1254.

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

Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, S., Ikai, A. and Takashima, A. (2006). Increased levels of granular tau oligomers: An early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci. Res.* 54: 197–201.

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

Malcolm, J.C., Breuillaud, L., Do Carmo, S., Hall, H., Welikovitsh, L.A., Macdonald, J.A, Goedert, M. and Cuelllo, A.C. (2019). Neuropathological changes and cognitive deficits in rats transgenic for human mutant tau recapitulate human tauopathy. *Neurobiol Dis.* 127: 323-338.

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

Martisova, E., Aisa, B., Guereñu, G. et Ramírez, M.J. (2013). Effects of early maternal separation on biobehavioral and neuropathological markers of Alzheimer's disease in adult male rats. *Curr. Alzheimer Res.* 10: 420–32.

Mazon, J.N., de Mello, A.H., Ferreira, G.K. et Rezin, G.T. (2017). The impact of obesity on neurodegenerative disease. *Life Sci.* 182: 22-28.

McKibben, K. M., and Rhoades, E. (2019). Independent tubulin binding and polymerization by the proline-rich region of Tau is regulated by Tau's N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 294: 19381–19394.

Mielke, M.M. (2019). Sex and gender differences in Alzheimer's disease dementia. *Psychiatr Times.* 35(11): 14–17.

Miklossy, J., Qing, H., Radenovic, A., Kis, A., Vilenó, B., László, F., ..., McGeer, P.L. (2010). Beta amyloid and hyperphosphorylated tau deposits in the pancreas in type 2 diabetes. *Neurobiol Aging.* 31(9): 1503-1515.

Min SW, Chen X, Tracy TE, Li Y, Zhou Y, Wang C, Shirakawa K, Minami SS, Defensor E, Mok SA et al (2015). Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nat Med.* 21: 1154–1162.

Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Zhu, X., Moreira, P.I., Acevedo-Aquino, M.C. and Williams, S. (2013). Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: Implications for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 940603.

Muehlich, S., Hermanns, C., Meier, M.A., Kircher, P. and Gudermann, T. (2016). Unravelling a new mechanism linking actin polymerization and gene transcription. *Nucleus.* 7(2): 121–125.

Mukrasch ,M.D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* 7: e34.

Müller, R., Heinrich, M., Heck, S., Blohm, D., Richter-Landsberg, C. (1997). *Cell Tissue Res.* 288: 239–249.

Müller, S., Ledl, A. and Schmidt, D. (2004). SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene.* 23: 1998–2008.

Myeku, N., Clelland, C.L., Emrani, S., Kukushkin, N.V., Yu, W.H., Golberg, A.L. and Duff. K.E. (2016). Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nat Med.* 22(1): 46–53.

Nathan, J.A., Tae Kim, H., Ting, L., Gygi, S.P. and Goldberg, A.L. (2013). Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? *EMBO J.* 32: 552–65.

Nelson, R.L., Guo, Z., Halagappa, V.M., Pearson, M., Gray, A.J., Matsuoka, Y., Brown, M., Martin, B., Iyun, T., Maudsley, S., Clark, R.F., Mattson, M.P. (2007). Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioral deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3xTgAD mice. *Exp Neurol.* 205(1): 166-76.

Nieznanska, H., Boyko, S., Dec, R., Redowicz, M.J., Dzwolak, W. and Nieznanski, K. (2021). Neurotoxicity of oligomers of phosphorylated Tau protein carrying tauopathy-associated mutation is inhibited by prion protein. *BBA - Molecular Basis of Disease.* 1867(11): 166209.

Nixon, R.A. (2006). Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci.* 29: 528–535.

Oddo, S. (2008). The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 12(2): 363–373.

- Oh, S., Hong, H.S., Hwang, E., Sim, H.J., Lee, W., Shin, S.J. and Mook-Jung, I. (2005). Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mech Ageing Dev.* 126: 1292–9.
- Olesen, O.F. (1994). Proteolytic degradation of microtubule associated protein tau by thrombin. *Biochem Biophys Res Commun.* 201: 716–21.
- Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Navarrete, M., Esteban, J.A., Hernandez, F., Avila, J. and Llorens-Martin, M. (2016). Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis. *EMBO J.* 35: 1417–1436.
- Park, S. Lee, J.H., Jeon, J.H. and Lee, M.J. (2018). Degradation or aggregation: the ramifications of post-translational modifications on tau. *BMB Reports.* 51(6): 265-273.
- Pei, J.J., Tanaka, T., Tung, Y.C., Braak, E., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. (1997). Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56:70–78.
- Penzes, P. and Vanleeuwen, J.E. (2011). Impaired regulation of synaptic actin cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* 67(1-2): 184-192.
- Pietrzak, R.H., Lim, Y.Y., Neumeister, A., Ames, D., Ellis, K.A., Harrington, K., ..., Maruff, P. (2015). Amyloid- β , Anxiety, and Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer Disease. *JAMA Psychiatry.* 72(3): 284-291.
- Pilliod, J., Desjardin, A., Pernègre, C., Jamann, H., Larochelle, C., Fon, E.A. and Leclerc, N. (2020). Clearance of intracellular tau protein from neuronal cells via VAMP8-induced secretion. *J Biol Chem.* 295(51): 17827–17841.
- Pooler, A.M. et Hanger, D.P. (2010). Functional implications of the association of tau with the plasma membrane. *Biochem Soc Trans.* 38: 1012– 1015.
- Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M., Nachury, M.V. (2017). Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat. Cell Biol.* 19: 391-398.

Qi, H., Cantrelle, F.X., Benhelli-Mokrani, H., Smet-Nocca, C., Buee, L., Lippens, G., Bonnefoy, E., Galas, M.C. and Landrieu, I. (2015). Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of interaction of tau with DNA and its regulation by phosphorylation. *Biochemistry*. 54: 1525–1533.

Quinn, J.P., Corbett, N.J., Kellett, K.A.B. and Hooper, N.M. (2018). Tau proteolysis in the pathogenesis of tauopathies: neurotoxic fragments and novel biomarkers. *J Alzheimers Dis*. 63(1): 13–33.

Ramsden, M, Kotilinek, L., Forster, C., Paulson, J., McGowan, E., SantaCruz, K., ..., Ashe, K.H. (2005). Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci*. 25(46): 10637-10647.

Reyes, J.F., Geula, C., Vana, L. and Binder, L.I. (2012). Selective tau tyrosine nitration in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol*. 123: 119–132.

Rivera, E.J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J.R. et de la Monte, S.M. (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis*. 8(3): 247-68.

Robertson, S.P. (2007). Otopalatodigital syndrome spectrum disorders: otopalatodigital syndrome types 1 and 2, frontometaphyseal dysplasia and Melnick-Needles syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 15: 3–9.

Roseblatt, M., Fellous, A., Mazie, J.C., Delacourte, A. and Defossez, A. (1989). Alzheimer's disease: microtubule-associated proteins 2 (MAP 2) are not components of paired helical filaments. *FEBS Lett*. 252 (1-2): 91-94.

Rossi, G., Conconi, D., Panzeri, E., Redaelli, S., Piccoli, E., Paoletta, L., Dalpra, L. and Tagliavini, F. (2013). Mutations in MAPT gene cause chromosome instability and introduce copy number variations widely in the genome. *J Alzheimer's Dis.* 33: 969–982.

Rossi, G., Dalpra, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F.L., Catania, M., ..., Tagliavini, F. (2008). A new function of microtubule-associated protein tau: Involvement in chromosome stability. *Cell Cycle.* 7: 1788–1794.

Rossi, G. and Tagliavini, F. (2015). Frontotemporal lobar degeneration: old knowledge and new insight into the pathogenetic mechanisms of tau mutations. *Front. Aging Neurosci.* 7: 192.

Rubinsztein, D.C., DiFiglia, M., Heintz, N., Nixon, R.A., Qin, Z.H., ..., Tolkovsky, A. (2005). Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy.* 1: 11-22.

Sahara, N., Maeda, S., Murayama, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Yen, S.H. and Takashima, A. (2007). Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur. J. Neurosci.* 25: 3020–3029.

Schweers, O., Mandelkow, E.M., Biernat, J. and Mandelkow, E. (1995). Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein τ controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 8463–8467.

Segura, I., Lange, C., Knevels, E., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Eelen, G., ..., Carmeliet, P. (2016). The Oxygen Sensor PHD2 Controls Dendritic Spines and Synapses via Modification of Filamin A. *Cell Reports.* 14: 2653–2667.

Seitz, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E.M., Song, Y.H. and Mandelkow, E. (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *EMBO J.* 21: 4896–4905.

Seward, M.E., Swanson, E., Norambuena, A., Reimann, A., Cochran, J.N., Li, R., Roberson, E.D., Bloom, G.S. (2013). Amyloid- β signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease. *J. Cell Sci.* 126: 1278–1286.

Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S.P. and Kosik K.S. (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* 279: 4869-4876.

Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., Feldman, E.L. (2010). How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nat Rev Neurol.* 6(10): 551-559.

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

Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E. and Constantin, G. (2020). *In vitro* models of neurodegenerative diseases. *Frontiers Cell and Dev. Bio.* 8: 328.

Sokolow, S., Henkins, K.M., Bilousova, T., Gonzalez, B., Vinters, H.V., Miller, C.A., Cornwell, L., Poon, W.W. and Gylys, K.H. (2015). Pre-synaptic C-terminal truncated tau is released from cortical synapses in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 133: 368–379.

Song, Y. and Brady, S.T. (2015). Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol.* 25: 125–136.

Su, J.H., Zhao, M., Anderson, A.J., Srinivasan, A. and Cotman, C.W. (2001). Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res.* 898: 350–357.

Sugino, E., Nishiura, C., Minoura, K., In, Y., Sumida, M., Taniguchi, T., Tomoo, K. and Ishida, T. (2009). Three-/four-repeat-dependent aggregation profile of tau microtubule-binding domain clarified by dynamic light scattering analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385: 236–240.

Sultan, A., Nesslany, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., ..., Galas, M.C. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* 286: 4566–4575.

Szyk, A., Deaconsecu, A.M., Spector, J., Goodman, B., Valenstein, M.L., Ziolkowska, N.E., ..., Roll-Mecak, A. (2014). Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell.* 157 (2014): 1405-1415.

Tao, P., Yang, S.N., Tung, Y.C. and Yang, M.C. (2019). Development of Alzheimer disease in old major depressive patients based upon their health status. *Medicine (Baltimore).* 98(20): e15527.

Tennstaedt, A., Popsel, S., Truebestein, L., Hauske, P., Brockmann, A., Schmidt, N., ..., Ehrmann, M. (2012). Human high temperature requirement serine protease A1 (HTRA1) degrades tau protein aggregates. *J Biol Chem.* 287: 20931–20941.

Tigges, U., Koch, B., Wissing, J., Jockusch, B.M. and Ziegler, W.H. (2003). The F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and in vivo substrate for protein kinase C alpha. *J. Biol. Chem.* 278, 23561-23569.

Tracy, T.E. and Gan, L. (2017). Acetylated tau in Alzheimer's disease: An instigator of synaptic dysfunction underlying memory loss: Increased levels of acetylated tau blocks the postsynaptic signaling required for plasticity and promotes memory deficits associated with tauopathy. *BioEssays*, 39(4): 1600224.

Trevino, V., Falciani, F. and Barrera-Saldaña, H.A. (2007). DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Molecular Medicine.* 13: 527–541.

Trushina, N.I., Bakota, L., Mulkidjanian, A.Y. et Brandt, R. (2019). The Evolution of Tau Phosphorylation and Interactions. *Front. Aging Neurosci.* 11:256.

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

Vadlamudi, R.K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T.P., and Kumar, R. (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat. Cell Biol.* 4: 681-690.

Vangipuram, M., Ting, D., Diaz, R. and Schüle, B. (2013). Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts. *J Vis Exp.* (77): 3779.

Vanier, M.T., Neuville, P., Michalik, L., Launay, J.F. (1998). Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J Cell Sci.* 111: 1419–1432.

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

Violet, M., Chauderlier, A., Delattre, L., Tardivel, M., Chouala, M.S., Sultan, A., ..., Galas, M.C. (2015). Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo. *Neurobiol Dis.* 82: 540–551.

Vitek, M.P., Araujo, J.A., Fossel, M., Greenberg, B.D., Howell, G.R., Sukoff Rizzo, S.J., ..., Edelmayer, R.M. (2020). Translational animal models for Alzheimer’s disease: An Alzheimer’s association business consortium think tank. *Alzheimer’s & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions.* 6(1): e12114.

Wada, M., Noda, Y., Shinagawa, S., Chung, J.K., Sawada, K., Ogyu, K., ..., Nakajima, S. (2018). Effect of education on Alzheimer’s disease-related neuroimaging biomarkers in healthy controls, and participants with mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease: A cross-sectional study. *Journal of Alzheimer’s Disease.* 63(2): 861-869.

Wallin, C., Sholts, S.B., Österlund, N., Luo, J., Jarvet, J., Roos, P.M., ..., Wärmländer, S.K.T.S (2017). Alzheimer’s disease and cigarette smoke components: effects of nicotine, PAHs, and Cd(II), Cr(III), Pb(II), Pb(IV) ions on amyloid- β peptide aggregation. *Scientific Reports.* 7: 14423.

Wang J. Z. and Liu F. (2008). Microtubule-associated protein tau indevelopment, degeneration and protection of neurons. *Prog. Neu-robiol.* 85: 148–175.

Withers-Ward, E. S., Mueller, T. D., Chen, I. S. and Feigon, J. (2000). Biochemical and structural analysis of the interaction between the UBA(2) domain of the DNA repair protein HHR23A and HIV-1 Vpr. *Biochemistry*. 39: 14103–14112.

Woo, M.S., Ohta, Y., Rabinovitz, I., Stossel, T.P. and Blenis, J. (2004). Ribosomal S6 Kinase (RSK) Regulates Phosphorylation of Filamin A on an Important Regulatory Site. *Mol Cell Biol*. 24(7): 3025–3035.

Yan, J., Sun, X.-B., Wang, H.-Q., Zhao, H., Zhao, X.-Y., Xu, Y.-X., Guo, J.-C. et Zhu, C.-Q. (2010). Chronic restraint stress alters the expression and distribution of phosphorylated tau and MAP2 in cortex and hippocampus of rat brain. *Brain Res*. 1347: 132–141.

Yang, C., Guo, X., Wang, G.H., Wang, H.L., Liu, Z.C., Liu, H., Zhu, Z.X. et Li, Y. (2014). Changes in tau phosphorylation levels in the hippocampus and frontal cortex following chronic stress. *Brazilian J. Med. Biol. Res*. 47: 237-44.

Yang, Q., Luo, C., Zhang, X., Liu, Y., Wang, Z., Cacciamani, P., ..., Wang, X. (2020). Tartary buckwheat extract alleviates alcohol-induced acute and chronic liver injuries through the inhibition of oxidative stress and mitochondrial cell death pathway. *Am J Transl Res.*; 12(1): 70-89.

Yang, X.J. and Seto, E. (2008). Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*. 31: 449–461.

Yoshii, S.R. and izushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci*. 18(9): 1865.

Yu C.-H., Si T., Wu W.-H., Hu J., Du J.-T., Zhao Y.-F. and Li Y.-M. (2008). O-GlcNacylation modulates the self-aggregation ability of the fourth microtubule-binding repeat of tau. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 375: 59–62.

Yue, J., Wang, Q., Lu, H., Brenneman, M., Fan, F. and Shen, Z. (2010). The Cytoskeleton protein filamin-A is required for an efficient recombinational DNA double strand break repair. *Cancer Res*. 69(20): 7978–7985.

Yuede, C.M., Timson, B.F., Hettinger, J.C., Yuede, K.M., Edwards, H.M., Lawson, J.E., Zimmerman, S.D. et Cirrito, J.R. (2018). Interactions between stress and physical activity on Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol. Stress.* 8: 158–171.

Zare-shahabadi, A., Masliah, E., Johnson, G.V.W. and Rezaei, N. (2015). Autophagy in Alzheimer's Disease. *Rev Neurosci.* 26(4): 385–395.

Zempel, H., Luedtke, J., Kumar, Y., Biernat, J., Dawson, H., Mandelkow, E. and Mandelkow, E.M. (2013). Amyloid- β oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TTL6 and spastin. *EMBO J.* 32: 2920–2937.

Zempel, H. and Mandelkow, E.M. (2015). Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia. *Mol Neurodegener.* 10: 68.

Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Kang, S.S., Kwon, I.S., Duong, D.M., ..., Ye, Keqiang (2015). Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Nat Med.* 20(11): 1254–1262.

Zhang, F., Su, B., Wang, C., Siedlak, S.L., Mondragon-Rodriguez, S. Lee, H., ..., Zhu, X. (2015). Posttranslational modifications of α -tubulin in alzheimer disease. *Translational Neurodegeneration.* 4: 9.

Zhao, W. Q. and Lu, B. (2007). Expression of annexin A2 in GABAergic interneurons in the normal rat brain. *J. Neurochem.* 100: 1211–1223.

Zhong, Q., Congdon, E.E., Nagaraja, H.N. and Kuret, J. (2012). Tau isoform composition influences rate and extent of filament formation. *J Biol Chem.* 287: 20711–20719.

Zhou, S., Yi, T., Liu, R., Bian, C., Qi, X., He, X., ..., Wei, Y. (2012). Proteomics identification of Annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis. *Molecular and cellular proteomics.* 11(7): 1-24.

Zilka, N.; Filipcik, P.; Koson, P.; Fialova, L.; Skrabana, R.; Zilkova, L.; Rolkowa, G.; Kontsekova, E. and Nova, M. (2006). Truncated tau from sporadic Alzheimer's diseases suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett.* 580: 3582–3588.

Zhang, J. and Dong, X.P. (2012). Dysfunction of microtubule-associated proteins of MAP2/tau family in prion disease. *Prion.* 6 (4): 334-338.

Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M.A. and Perry, G. (2007). Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci.* 64: 2202–2210.