

UNIVERSITE DE LIMOGES  
ECOLE DOCTORALE n°258 : Science – Technologie – Santé  
FACULTE DE MEDECINE  
EA 3842 Homéostasie Cellulaires et Pathologies  
Unité de Neurobiologie Cellulaire

Année : 2006

Thèse N° [   ]

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

**Discipline / Spécialité : Biologie Cellulaire et Biologie**

**Moléculaire**

présentée et soutenue par

**Armelle RAMETTI**

le 29 juin 2006

**Implication de la protéine tau  
dans la dégénérescence neuronale *in vitro***

Thèse co-dirigée par Mme le Docteur F. ESCLAIRE et M. le Docteur F. TERRO

**JURY :**

Rapporteurs

**Jean-Marc MULLER** – Professeur des Universités, CNRS UMR6187 Poitiers

**Didier PELAPRAT** – Directeur de Recherche, INSERM U773 Paris

Examineurs

**Philippe COURATIER** – Professeur, Praticien Hospitalier, CHU Limoges

**Françoise ESCLAIRE** – Maître de Conférences-Praticien Hospitalier, EA 3842 Limoges

**Faraj TERRO** – Maître de Conférences-Praticien Hospitalier, EA 3842 Limoges

*A ma mère,  
A mon père,  
A ma sœur Emilie,*

*Sans vous je n'aurais rien pu faire...*

## **REMERCIEMENTS**

Ce travail a été effectué à la Faculté de Médecine de l'Université de Limoges, au sein de l'équipe d'accueil 3842 « Homéostasie Cellulaire et Pathologies » dirigée par Madame le Professeur M.O. JAUBERTEAU.

Ce travail a été réalisé plus particulièrement dans l'Unité de Neurobiologie Cellulaire dirigée par Madame le Professeur C. YARDIN. Je lui exprime ma gratitude pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire et la remercie pour ses conseils, sa disponibilité et son soutien.

J'adresse mes remerciements à Madame le Docteur F. ESCLAIRE pour m'avoir donné les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail de recherche. J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Docteur F. TERRO qui a dirigé cette thèse et contribué à l'aboutissement de ce travail. Leur co-encadrement m'a conduit à tirer le meilleur de moi-même et cette expérience me servira sans aucun doute pour la suite.

J'exprime ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur J.M. MULLER et à Monsieur le Docteur D. PELAPRAT qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur P. COURATIER qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail et de participer à ce jury.

J'associe à ces remerciements Mesdames M.L. Autef, I. Teissandier et F. Forestier pour leur gentillesse et leur disponibilité. Merci Françoise pour ton sens pratique, ton aide précieuse notamment dans la gestion de nos commandes, de nos tracas quotidien de labo...

Aux techniciennes du labo Sandrine, Nathalie, Delphine, Malvina, Patricia, Isabelle, Christiane un grand merci pour votre bonne humeur et votre amitié. Merci les filles pour nos petites soirées... Je remercie également Sylvie pour son soutien et son amitié. Merci également aux « stagiaires » avec qui j'ai tissé des liens d'amitié Mathilde et Clémentine.

Je tiens également à remercier Monsieur Jacques Demoment et Yvon qui ont pris soin des animaux au CHU, ainsi que Florence et Sylvie qui ont pris soin des animaux à la fac.

A mes amis Carine, Gaël, Vanessa, Martine, Karine, Gérald, Sophie, Marc, Delphine, ma p'tite Stéph, Valérie, Olivier V, Anne, Olivier D, Eric, Cédric, ... pour tous les bons moments passés leur compagnie au travail ou en dehors. Carinette (je sais que tu n'aimes pas quand on t'appelle comme ça !) si loin à Paris, merci pour nos nombreux échanges d'email qui m'ont fait du bien. Merci Gaël pour ton soutien et ton amitié, je me souviendrai particulièrement d'un repas mémorable ! Vanessa, merci pour ces cafés serrés qui m'ont tenu éveillée quand j'en avais besoin.

Une pensée particulière pour Barbara et Gaëlle en souvenir de nos cours de Sages-Femmes et merci à Cathy Decourt pour m'avoir permis de faire des TP avec elle. Merci à Jenny pour tes corrections de publi, ta gaieté et ta bonne humeur et en souvenir des « petits soucis » de western blot !

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues du 2<sup>nd</sup> et du 1<sup>er</sup> (Christophe, Mireille, Marie-Hélène, Gaëlle, Serge, Barbara, Stéphanie, Linda, Julian, Elodie, Marie-Odile, Fabrice). Et enfin, je voudrais adresser un remerciement particulier à tous les étudiants et personnes des Facultés de Pharmacie et de Médecine qui m'ont aidé et soutenu. Pardon de ne pas tous vous citer.

Un très grand merci à toute ma famille, mes parents, ma sœur... pour tous nos échanges téléphoniques qui entretiennent le moral et les bons petits plats de ma maman!

Enfin, merci à Fabrice, pour avoir accepté de passer avec moi cette période parfois agité, pour m'avoir soutenu, encouragé, supporté malgré mes humeurs et mes doutes et surtout pour être toujours là, présent à mes côtés.

## ABREVIATIONS

- ADN** : acide désoxyribonucléique
- ADNc** : AND complémentaire
- AIF**: apoptosis inducing factor
- ALLN** : N-acétyl-Leu-Leu-Nle-CHO
- AMC** : 7-amino-4-méthylcoumarine
- AMPc** : adénosine monophosphate cyclique
- ANT**: transporteur de nucléotide adénylique
- Apaf-1** : apoptotic protease activating factor-1
- ARN**: acide ribonucléique
- ATP** : adenosine triphosphate
- Bad**: bcl-X<sub>L</sub>/bcl-2 associated death promoter homolog
- Bag**: bcl-2-associated athanogene
- Bak**: bcl-2 homologous antagonist/killer
- BAR**: bifunctional apoptosis regulator
- Bax**: bcl-2 associated X protein
- Bcl-2**: B-cell leukaemia/lymphoma 2-like
- Bcl<sub>XL</sub>**: longer alternatively spliced form of Bcl-x
- Bcl<sub>XS</sub>**: shorter alternatively spliced form of Bcl-x
- BH**: Bcl-2 homology
- Bid**: BH3 interacting death domain agonist
- Bik**: Bcl-2 interacting killer
- Bim**: Bcl-2 interacting mediator of cell death
- BIR**: Baculovirus IAP Repeat
- Bmf**: a BH3 only protein
- Boc-D-FMK** : t-butoxycarbonyl-Asp(OMe)-fluoromethyl-ketone
- BSA** : Bovin Serum Albumin, albumine sérique bovine
- CAD** : caspase activated DNase

**CARD** : caspase recruitment domain

**CBD** : dégénérescence cortico-basale

**Cdk** : kinases dépendantes des cyclines

***C. elegans*** : *Caenorhabditis elegans*

**Ced** : *C. elegans* death

**CHIP** : carboxy terminus of Hsp70-interacting protein

**CHOP**: C/EBP homologus protein

**Cyt c** : cytochrome c

**Cyt-D** : cyclophiline

**DAPI** : 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole

**DD** : death domain

**DED** : death effector domain

**$\Delta\Psi_m$**  : potentiel mitochondrial

**DFF**: facteur de fragmentation de l'ADN

**DFT** : démences fronto-temporales

**Dfu** : 5-fluoro-2'-désoxyuridine et d'uridine

**DIABLO** : direct IAP binding protein with low pI

**DISC** : death inducing signaling complex

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**DNF** : dégénérescence neurofibrillaire

**DR** : death receptors

**DR3L**: Death Receptor 3 Ligand

**DS** : syndrome de Down

**DTT** : dithiothréitol

**E2**: ubiquitin-conjugating enzyme

**ED** : eau distillée

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

**EGTA** : Acide Ethylène Glycol-bis[ $\alpha$ -aminoéthyléther]-N,N,N',N'-Tétra Acétique

**Egl-1**: egg-laying defective

**FADD:** Fas-associated death domain

**FasL:** Fibroblast-associated Ligand

**FITC :** Fluoresceine IsoThioCyanate

**FLIP:** FLICE Inhibitory Protein

**FTDP-17 :** démence fronto-temporale avec Parkinson liée au chromosome 17

**GSK-3 $\beta$  :** glycogen synthase kinase-3

**Hid:** head involution defective

**Hsp :** heat shock proteins

**IAP:** inhibitors of apoptosis protein

**ICE:** interleukin-1 $\beta$  converting enzyme

**JNK :** kinase c-jun

**kDa :** kilo dalton

**KO :** knockout

**LEF :** Lymphoid Enhancer-binding Factor

**MAP-kinase :** mitogen activated protein kinase

**MARK :** microtubule-affinity-regulating kinase

**Mcl-1:** ML-1 human myeloid leukemia cell line

**MEM :** Minimum Essential Medium

**MG132 :** N-LBZ-Leu-Leu-Leu-Al

**MTT :** 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide

**NaVO<sub>3</sub> :** sodium orthovanadate

**Noxa:** BH3-only member of the Bcl-2 family

**OKA :** acide okadaïque

**PAK-2:** p21-activated kinase

**PARP:** Poly-(ADP-ribose) polymérase

**PBS :** tampon phosphate salin

**PDPK :** Proline Directed Protein Kinases

**PHF :** paires hélicoïdales de filaments

**PKA :** cAMP-dependent protein kinase

**PMSF** : phenylmethanesulfonyl fluoride  
**PSP** : paralysie supranucléaire progressive  
**PTP**: pore de transition de perméabilité  
**PUMA**: P53-Upregulated Modulator of Apoptosis  
**PVDF** : polyvinylidène difluoride  
**RE**: réticulum endoplasmique  
**Rpr**: reaper  
**RT** : reverse transcription  
**SAM**: sterile alpha-motif  
**SAPK** : stress-activated protein kinases  
**SDS** : dodécylsulfate de sodium  
**SIMP**: soluble inter membrane mitochondrial proteins  
**SVF** : sérum de veau fœtal  
**Tau FL** : full-length, forme entière  
**TBS** : Tris Buffer Saline  
**TCF** : T-Cell Factor  
**TLCK** : N $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone  
**TM** : trans-membranaire  
**TNF-R** : tumor necrosis factor receptor  
**TPCK** : N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone  
**TRAIL**: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand  
**TRITC** : Tetra methyl Rhodamine IsoThioCyanate  
**TWEAK**: weak homologue of TNF  
**Ub** : ubiquitine  
**UBD** : domaine ubiquitin-like  
**VDAC** : canal anionique voltage-dépendant  
**WD-40** : 40 répétitions tryptophane/acide aspartique  
**XIAP** : X-linked IAP



# Sommaire

<b>Introduction générale.....</b>	<b>12</b>
<b>Partie bibliographique .....</b>	<b>16</b>
<b>Partie 1 : La mort cellulaire .....</b>	<b>17</b>
I- Différents types de mort cellulaire .....	17
II- L'apoptose.....	20
1- Les gènes de l'apoptose .....	21
2- Phases et mécanismes généraux de l'apoptose .....	24
2-1 Phase d'initiation .....	26
2-2 Phase de régulation par les protéines de la famille Bcl-2 .....	35
2-3 Phase d'exécution par les caspases .....	38
2-4 Autres mécanismes régulant l'apoptose.....	46
III- Apoptose et pathologies .....	49
<b>Partie 2 : La protéine tau.....</b>	<b>54</b>
I- Structure de la protéine tau .....	54
1- Le gène de la protéine tau humaine et son expression.....	54
2- Les différentes isoformes de la protéine tau humaine .....	56
3- Les différentes isoformes de la protéine chez les autres mammifères .....	57
II- Les modifications post-traductionnelles de la protéine tau .....	58
1- Phosphorylation .....	59
2- Glycosylation, glycation et autres modifications.....	64
III- La localisation de la protéine tau .....	65
IV- Fonctions de la protéine tau .....	66
1- La liaison de tau aux microtubules .....	66
2- La maturation des neurones et le transport axonal.....	70
V- La protéine tau et les maladies neurodégénératives.....	71
1- La protéine tau et la maladie d'Alzheimer.....	72
1-1 Les deux principales lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer .....	72
1-2 Les protéines tau des PHF.....	74
1-3 Phosphorylation de tau dans les PHF.....	75
1-4 Autres modifications post-traductionnelles dans les protéines tau-PHF .....	78
1-5 Agrégation de la protéine tau-PHF .....	80
1-6 Localisation de la protéine tau-PHF .....	80
2- La protéine tau et les autres tauopathies .....	81
2-1 Les maladies neurodégénératives associées au triplet pathologique de la protéine tau .....	81
2-2 Les maladies neurodégénératives associées à des protéines tau différentes.....	82
3- Les modèles transgéniques de tauopathies .....	86
<b>Partie 3 : La protéine tau et la mort neuronale.....</b>	<b>88</b>
I- Modifications de l'état de phosphorylation de la protéine tau au cours de l'apoptose ....	88
II- Clivage protéolytique de la protéine tau au cours de l'apoptose.....	89

III- Relations entre l'expression de tau et la mort neuronale .....	92
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>97</b>
I- Culture primaire de neurones corticaux.....	98
II- Traitements des cultures.....	99
III- Etude de la toxicité par le test au MTT.....	101
IV- Analyse protéique par western blot et immunocytochimie .....	101
1- Anticorps utilisés .....	101
2- Western blotting.....	103
2-1 Extraction des protéines totales .....	103
2-2 Fractionnement des formes soluble et liée de tau .....	104
2-3 Dosage protéique .....	104
2-4 Migration.....	105
2-5 Transfert.....	106
2-6 Immunoblots .....	106
3- Immunocytochimie .....	107
V- Analyse quantitative de l'apoptose par la détection de la fragmentation de l'ADN génomique <i>in situ</i> .....	108
1- Marquage nucléaire au DAPI.....	108
2- Technique du TUNEL.....	109
VI- Dosage de l'activité de la caspase-3 .....	109
VII- Analyse de l'expression des ARN.....	110
1- Extraction des ARN totaux .....	110
2- Transcription inverse .....	111
3- Réaction de la polymérisation en chaîne quantitative.....	111
VIII- Statistiques .....	112
<b>Résultats .....</b>	<b>113</b>
<b>Partie 1 : Lien entre les changements dans la phosphorylation et le clivage de tau durant l'apoptose neuronale.....</b>	<b>114</b>
I- L'augmentation de la phosphorylation de la protéine tau précède sa déphosphorylation et son clivage au cours de l'apoptose.....	115
II- Le clivage de la protéine tau est associé avec sa déphosphorylation et est corrélé avec l'apparition de caractères apoptotiques .....	119
III- Un changement de distribution de la protéine tau déphosphorylée est observé dans les neurones apoptotiques .....	129
IV- Le changement de localisation de tau déphosphorylée lié à l'apoptose est dû au clivage de tau et non à sa déphosphorylation .....	131
V- L'inhibition des caspases restaure une distribution normale de tau déphosphorylée, empêche le clivage de tau et l'apoptose .....	133
VI- Les calpaïnes agissent après le clivage de la protéine tau par les caspases.....	137
VII- La déphosphorylation préalable de la protéine tau augmente la vulnérabilité neuronale de l'apoptose et le clivage de tau .....	140
<b>Partie 2 : Le lithium régule négativement l'expression de tau dans les cultures de neurones corticaux : un mécanisme possible de son rôle neuroprotecteur ? .....</b>	<b>150</b>
I- Le traitement au lithium induit une diminution du niveau de la protéine tau totale.....	152

II- La diminution de la protéine tau totale induite par le lithium ne résulte pas d'une perte neuronale .....	156
III- La diminution de la protéine tau totale induite par le lithium n'est pas liée au clivage et à la dégradation par les caspases, les calpaïnes et le protéasome .....	158
IV- La diminution de la protéine tau induite par le lithium est associée à la diminution de l'ARNm de tau .....	162
V- Une pré-exposition au lithium confère une neuroprotection face à la neurotoxicité du peptide A $\beta$ .....	163
<b>Discussion .....</b>	<b>165</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>179</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>183</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>212</b>

## **INTRODUCTION GENERALE**

La protéine tau est une protéine associée aux microtubules. Elle est fortement exprimée dans les neurones et se situe principalement dans les axones. Elle interagit avec les microtubules *via* des domaines spécifiques de liaison aux microtubules et favorise leur assemblage et leur stabilité. Tau est une phosphoprotéine qui contient environ 80 sites potentiels de phosphorylation (essentiellement des résidus thréonyls et séryls). Son interaction avec les microtubules est régulée par phosphorylation.

La régulation de l'état de phosphorylation de la protéine tau résulte des activités conjointes de protéines kinases telles que la glycogène synthétase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) et de protéines phosphatases telles que la protéine phosphatase 2A (PP2A).

En général, une hyperphosphorylation de la protéine tau diminue son affinité pour les microtubules, ce qui peut entraîner leur déstabilisation et par conséquent une désorganisation du cytosquelette. Or, une perturbation du cytosquelette intervient au cours de l'apoptose neuronale, indiquant que des modifications de l'état de phosphorylation de la protéine tau pourraient jouer un rôle important dans la mort neuronale par apoptose.

De très nombreuses maladies sont liées à des dérèglements de mécanismes qui contrôlent l'apoptose. Toute anomalie de l'apoptose peut être responsable du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologies caractérisées par un déficit ou à l'inverse par une activation inappropriée des mécanismes apoptotiques. Ainsi, l'apoptose pourrait être impliquée dans la mort neuronale observée au cours de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative progressive et irréversible qui affecte les fonctions cognitives, la mémoire et le comportement. Cette maladie constitue un problème de santé majeur, car elle touche 40 millions de personnes dans le monde, dont 900 000 en France, pour lesquelles il n'existe que des traitements idiopathiques et non curatifs. Cette maladie se caractérise par une perte neuronale et par deux types de lésions : une accumulation intraneuronale de protéines tau pathologiques formant des amas fibrillaires appelés PHF (paires hélicoïdales de filaments) qui constituent les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les plaques séniles ou plaques amyloïdes extracellulaires qui sont constituées de peptides  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ). Dans cette maladie, les liens entre ces deux principales lésions neuropathologiques (plaques séniles et dégénérescences neurofibrillaires) et la perte neuronale restent à élucider. A l'heure actuelle, il existe un large consensus autour de l'idée que la production et l'accumulation du peptide A $\beta$  jouent un rôle central dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer : c'est l'hypothèse de la cascade amyloïde. D'après

cette hypothèse la protéine tau n'aurait qu'un rôle potentialisateur dans le développement de cette maladie. En effet, les mécanismes mis en jeu dans la cascade amyloïde moduleraient l'activité des kinases et des phosphatases, impliquées dans l'hyperphosphorylation de tau, qui se trouvent en amont de la formation des DNF et contribueraient à l'extension de la dégénérescence neuronale.

Les causes de l'agrégation des protéines tau en DNF dans les neurones ne sont toujours pas élucidées. Une phosphorylation à elle seule de la protéine tau ne semble pas suffisante pour provoquer cette agrégation. D'autres modifications post-traductionnelles sont nécessaires à cette agrégation telles que le clivage ou des changements de conformation. Les cerveaux alzheimeriens présentent une activation des caspases et un clivage de tau. Certains auteurs suggèrent que l'inhibition du clivage par les caspases de la protéine tau pourrait être bénéfique, en empêchant la formation des DNF mais aussi en ralentissant le déclin cognitif. Il nous a semblé important de nous intéresser à la protéine tau qui pourrait être un élément clé de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer et ainsi, permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, il est très difficile d'étudier ces mécanismes *in situ* dans le cerveau, d'où l'intérêt d'utiliser des modèles *in vitro*.

De nombreuses études réalisées dans des modèles *in vitro* se sont intéressées aux modifications de la protéine tau apparaissant au cours de l'apoptose neuronale et en particulier aux modifications post-traductionnelles de cette protéine telles que les phénomènes de phosphorylation et de son agrégation.

Des données contradictoires ont montré l'existence d'une hyperphosphorylation mais aussi d'une déphosphorylation au cours de la dégénérescence neuronale. De plus un clivage de la protéine tau serait nécessaire et le fragment de 50 kDa, fibrillogène, pourrait favoriser l'extension des PHF en s'accumulant. Cependant, la relation entre ces modifications n'a pas été étudiée. La première partie de notre travail consiste à déterminer la séquence des modifications de phosphorylation de tau au cours de l'apoptose et d'étudier l'impact de ces modifications de tau sur son clivage, sur la dégénérescence neuronale et sur l'apoptose.

Par ailleurs, des travaux récents suggèrent qu'en produisant moins de protéines tau, le risque d'agrégation de tau est diminué et que la diminution de tau rend les neurones plus résistants au peptide A $\beta$  *in vitro*. En outre, il a été montré que la protéine tau peut être toxique

quand elle est surexprimée. D'autres auteurs ont montré *in vivo* que la suppression de l'expression de tau dans les souris tauopathiques améliore la perte de mémoire et prévient la perte neuronale. De plus, des travaux récents ont montré qu'un traitement chronique par le lithium, de souris tauopathiques, provoque une déphosphorylation de la protéine tau, améliore le déclin cognitif et réduit la mort neuronale. Le lithium, qui inhibe GSK-3 $\beta$ , bloquerait des voies pouvant mener à l'apoptose et pourrait ainsi avoir des effets neuroprotecteurs. Le but de la deuxième partie de notre travail est de déterminer si le lithium induit une diminution ou une modulation du niveau de tau présent dans les neurones et dans cette hypothèse, de déterminer quels sont les processus responsables de cette modulation. Et enfin, est-ce que la modulation du niveau de la protéine tau par le lithium est à l'origine ou est associée à un effet de neuroprotection ?

Dans ce mémoire, nous commencerons par faire une étude bibliographique sur la mort cellulaire et plus particulièrement sur l'apoptose et ses principaux acteurs moléculaires, ses différentes voies de signalisation et de régulation. Nous poursuivrons cette étude bibliographique en décrivant la structure, la localisation, les fonctions, les modifications post-traductionnelles et l'implication de la protéine tau dans les maladies neurodégénératives. Puis, nous étudierons les relations existantes entre la protéine tau et la mort neuronale.

Après avoir décrit les matériels et méthodes utilisés, nous exposerons les résultats obtenus lors de nos travaux visant à étudier l'implication de la protéine tau dans la dégénérescence neuronale puis nous les discuterons. Enfin nous terminerons ce manuscrit par une conclusion générale et nous exposerons des perspectives à notre travail.

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**



# **PARTIE 1 : LA MORT CELLULAIRE**

## **I- Différents types de mort cellulaire**

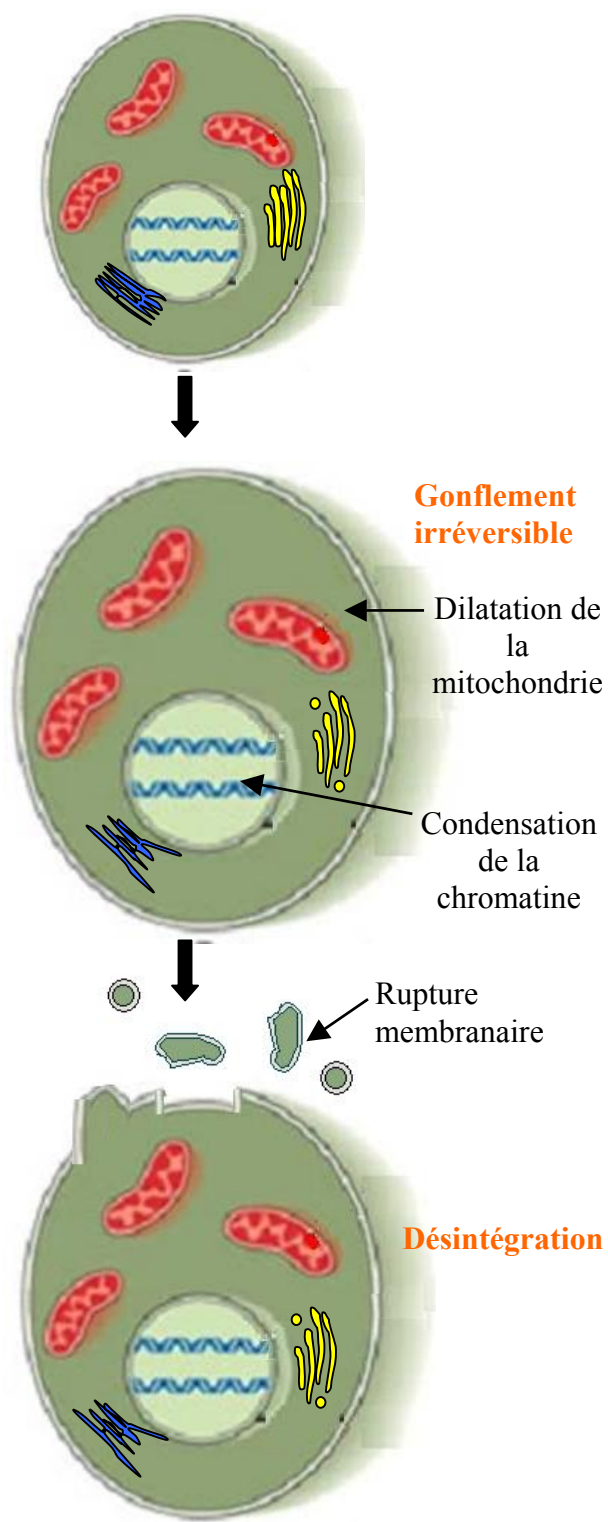
La mort cellulaire se produit naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement mais elle peut aussi avoir lieu dans des conditions pathologiques variées. Depuis le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, il est connu que la disparition d'une cellule peut résulter, non seulement d'une impossibilité à résister aux agressions externes, mais aussi d'une capacité à s'autodétruire. Ce n'est que depuis moins de trente ans que la mort cellulaire est considérée comme une fonction à part entière. Les trois types de mort cellulaire les plus classiquement décrits sont l'autophagie, la nécrose et l'apoptose. Ils se différencient grâce à des critères morphologiques, biochimiques et moléculaires.

Tout d'abord, l'autophagie apparaît dans de nombreux types cellulaires eucaryotes, où les organites et d'autres composants cellulaires sont séquestrés dans les lysosomes et dégradés par macro-autophagie. Le lysosome est un compartiment cellulaire enrichi en hydrolases capables de dégrader les protéines, les lipides et les acides nucléiques. La macro-autophagie, active à un niveau basal dans la plupart des cellules (prise en charge du renouvellement des protéines à longue durée de vie et de certains organites comme la mitochondrie), est stimulée en situation de stress. Ce processus d'autophagie représente un mécanisme de survie cellulaire et d'adaptation par le recyclage - notamment des acides aminés - et l'élimination des macromolécules et des structures cellulaires altérées (Klionsky et Emr, 2000). Ce mécanisme est indépendant des caspases (Guimaraes et Linden, 2004). Au cours de l'autophagie, les cellules ont un nucléoplasme et un cytoplasme plus sombres et contiennent quelques vacuoles autophagiques. Les organites de la cellule sont gonflés, la membrane plasmique perd ses spécificités et un bourgeonnement peut apparaître. Puis, le nombre et la taille des vacuoles augmentent et apparaissent sous forme de pâles inclusions dans le cytoplasme (Clarke, 1990). Le noyau se condense mais de façon moins remarquable que pour l'apoptose. Les derniers débris cellulaires sont souvent dégradés par hétérophagie et disparaissent entièrement.

La nécrose, quant à elle, est une mort « désordonnée » et accidentelle de la cellule. Celle-ci peut être due à une agression par des agents cytotoxiques physiques, chimiques, ou à des variations extrêmes des conditions physiologiques (Majno et Hertig, 1960). Elle se caractérise par une augmentation du volume cellulaire qui entraîne la lyse de la membrane plasmique de la cellule. Les organites (mitochondries, réticulum endoplasmique et noyau) vont, eux aussi, avoir tendance à gonfler (Bortner et Cidlowski, 1996). Après la rupture de la membrane, le contenu cytosolique est dispersé provoquant une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant (Figure 1).

Enfin nous nous intéresserons à l'apoptose qui se différencie de la nécrose d'un point de vue mécanistique. En effet, la nécrose est la conséquence passive d'une agression de la cellule alors que l'apoptose est parfaitement intégrée dans les processus physiologiques normaux de la cellule. Le terme d'apoptose ou mort cellulaire programmée a été introduit par Kerr et collaborateurs en 1972 pour décrire un processus actif du suicide cellulaire au cours du renouvellement normal des hépatocytes (Kerr et al, 1972). « Apoptose » est un nom qui signifie « chute des feuilles » en grec ancien et qui a été utilisé en référence à la chute des feuilles des arbres en automne, la chute des pétales de fleurs qui se fanent, une métaphore pour une mort à la fois naturelle, inéluctable et programmée (Ameisen, 2002). L'apoptose est une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères. Elle est nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement de tout organisme vivant notamment dans le renouvellement tissulaire et le développement du système nerveux. Elle participe à l'élimination des cellules surnuméraires, lors du développement embryonnaire, ou des cellules dysfonctionnelles pouvant être responsables du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologies. Un défaut d'apoptose peut entraîner l'apparition de maladies comme les cancers; à l'inverse, un excès d'apoptose peut participer à l'émergence de maladies neurodégénératives ou de syndromes d'immunodéficience comme le SIDA.

## A- NECROSE



## B- APOPTOSE

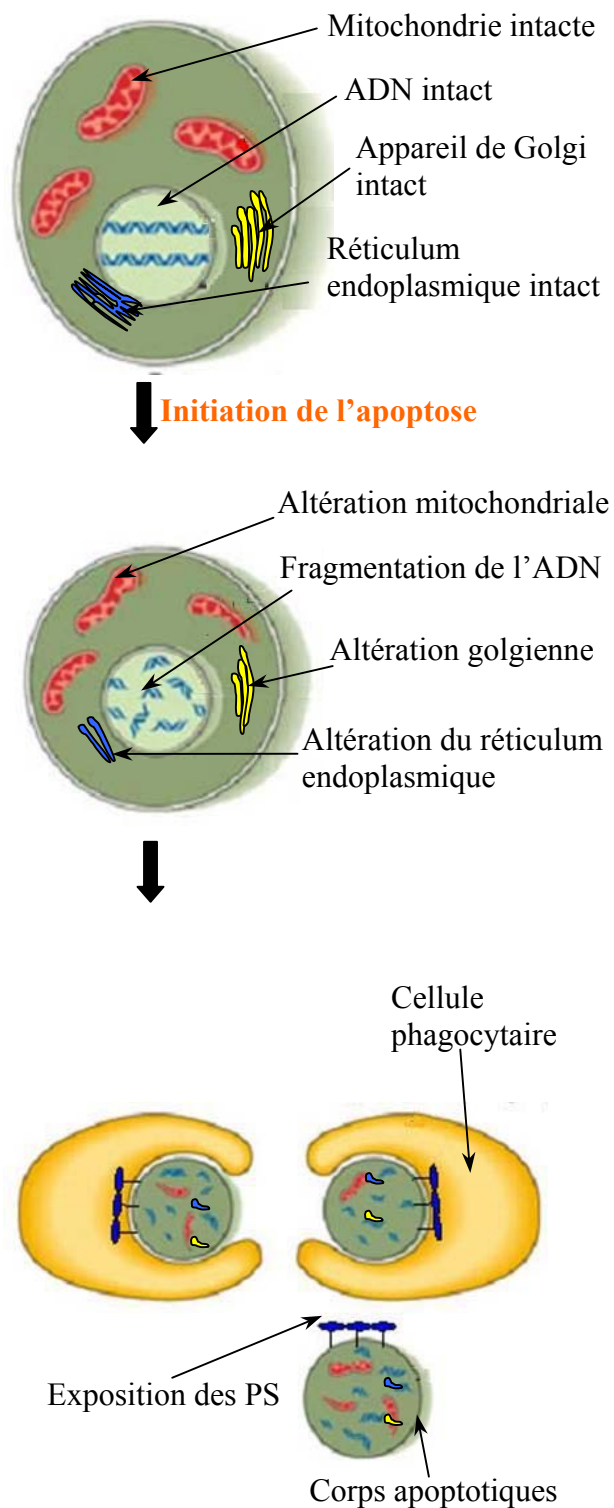


Figure 1 : Illustration des principales altérations de la cellule pendant la nécrose et l'apoptose (Adapté de Griffiths et al, Analyse génétique moderne, Edition De Boeck Université).

L'apoptose se réalise selon une séquence d'altérations morphologiques et chronologiques. Tout d'abord, les cellules en apoptose s'isolent des autres cellules et perdent tous les contacts existant auparavant. Une condensation du cytoplasme et une diminution significative du volume cellulaire apparaissent et se traduisent par des modifications de réfringence de la cellule. Les mitochondries des cellules apoptotiques subissent des modifications majeures : diminution du potentiel membranaire mitochondrial, modification de la perméabilité membranaire mitochondriale (Zamzami et al, 1996) et relargage dans le cytoplasme de molécules apoptogènes comme le cytochrome c (Yang et al, 1997). Après la diminution du potentiel membranaire mitochondrial, les cellules atteignent un point de non-retour. La chromatine se condense en volumineux amas. A la différence de la nécrose où le clivage de l'ADN a lieu de manière aléatoire libérant des fragments de grande taille, une fragmentation régulière de l'ADN est observée dans le cas de l'apoptose. Des endonucléases génèrent des fragments d'ADN réguliers multiples de 180 paires de bases (pb) (Wyllie et al, 1984) donnant après électrophorèse de l'ADN un profil caractéristique dit en « barreaux d'échelle ». Un bourgeonnement de la membrane plasmique apparaît, conduisant à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. De plus, grâce à l'externalisation des molécules membranaires de phosphatidylsérine qui se transloquent du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique (Platt et al, 1998), la cellule signale son état apoptotique à son environnement et va être rapidement phagocytée aboutissant à son élimination silencieuse. La phagocytose permet d'éviter toute libération du contenu cellulaire et de prévenir ainsi d'éventuelles lésions des cellules voisines. (Figure 1).

## **II- L'apoptose**

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, joue un rôle important dans l'embryogenèse, dans les changements morphologiques, dans l'homéostasie cellulaire ainsi que dans l'atrophie et la réparation des tissus. En effet, dès les premiers jours qui suivent la conception d'un nouvel être humain, la mort cellulaire joue un rôle essentiel dans la sculpture de nos « métamorphoses » successives. Dès que le stade de blastocyste, contenant les cellules souches embryonnaires, est achevé, la mort cellulaire devient nécessaire au déroulement des étapes ultérieures du développement. Ces dernières permettront la différenciation des premières familles de cellules dont dériveront progressivement plus de deux cents familles. La mort cellulaire sculpte notre forme interne et externe, celle de nos bras et de nos jambes,

puis éliminant les tissus séparant nos doigts, permet leur individualisation. Elle fait disparaître les ébauches des organes génitaux du sexe opposé, initialement présentes dans notre corps. C'est le cas du canal de Müller qui est détruit chez les hommes et du canal de Wolff, à l'origine de l'appareil reproducteur mâle, qui est détruit chez la femme.

L'apoptose joue également un rôle capital dans les phénomènes épigénétiques d'auto-organisation qui permettent la construction de nos deux organes de régulation les plus complexes : notre cerveau et notre système immunitaire, les supports de notre mémoire et de notre identité. En effet, au cours du développement du système nerveux central chez les vertébrés, environ 50% des neurones dégèrent au cours de la période périnatale. Ce phénomène est en partie contrôlé par des facteurs trophiques spécifiques. La survie des neurones dépendrait de leur capacité à accéder à une quantité suffisante de facteurs neurotrophiques (Raff et al, 1993). Dans le système immunitaire, l'apoptose joue un rôle crucial dans la sélection des lymphocytes ayant démontré leur capacité à défendre l'organisme sans pour autant l'agresser. Elle intervient également de façon déterminante dans la suppression de ces lymphocytes en surnombre après avoir rempli leur rôle dans la réponse immunitaire (Goldrath et Bevan, 1999).

Les recherches sur la mort cellulaire se sont accélérées grâce au travail de Horvitz et collaborateurs (1983) sur le développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), qui a permis d'identifier l'existence d'un programme moléculaire permettant aux cellules de déclencher leur mort. Les principaux acteurs moléculaires de l'apoptose ont ainsi été identifiés grâce à la découverte des gènes *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* (*ced* : *Caenorhabditis elegans death*) et *egl-1* (*egg-laying defective*) (Ellis et al, 1991). Ces découvertes ont été suivies par l'explosion des connaissances des mécanismes apoptotiques. En effet, les travaux sur l'apoptose se sont étendus à l'homme et ont mis en évidence l'existence de deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie intrinsèque (ou mitochondriale) et la voie extrinsèque (ou des récepteurs de mort).

## ***1- Les gènes de l'apoptose***

Les travaux menés sur le développement du nématode *C. elegans* ont permis d'identifier l'existence d'un programme moléculaire permettant aux cellules de déclencher leur mort (Horvitz et al, 1983). Ces recherches ont montré que sur 1090 cellules produites au cours du développement embryonnaire de *C. elegans*, 131 cellules meurent, certaines moins d'une

heure après le dédoublement cellulaire qui leur a donné naissance. Ces cellules meurent par apoptose. L'analyse de mutants génétiques de *C. elegans* a permis de mettre en évidence trois gènes qui jouent un rôle clé dans la régulation de cette mort cellulaire programmée. Ils ont pour nom *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* (Figure 2). *Ced-3* et *ced-4* sont tous les deux des gènes de mort, nécessaires à la cellule pour mourir, tandis que *ced-9* est un gène de survie nécessaire pour protéger les cellules de *C. elegans* qui doivent survivre à une activation inappropriée du programme de mort. Les gènes *ced-3* et *ced-4* sont donc requis pour l'initiation et l'exécution de l'apoptose. Le gène *ced-9* agit en amont des gènes *ced-3* et *ced-4* et inhibe leur activité pro-apoptotique. Enfin, un quatrième gène *egl-1* a été mis en évidence, il agit en amont des gènes *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* et régule négativement l'activité de *ced-9* (Metzstein et al, 1998).

Les analyses fonctionnelles des interactions des produits de ces gènes ont permis de définir un modèle d'activation de l'apoptose. La protéine Ced-9, en interagissant avec la protéine Ced-4, l'empêche d'activer la protéine Ced-3. Suite à un stimulus apoptotique, la protéine Egl-1 se lie à Ced-9 et l'inactive. La protéine Ced-4 est alors libérée et peut s'oligomériser avec Ced-3 ce qui provoque son auto-activation et mène à la mort cellulaire (Figure 2).

Au début des années 1990, une approche systématique de la mort cellulaire a été entreprise chez la drosophile. En effet, la drosophile présente une complexité intermédiaire entre le nématode et les mammifères pour la régulation et l'exécution de l'apoptose. White et collaborateurs (1994) ont démontré que ce processus intervenait lors du développement de la drosophile et que les cellules mortes présentaient les caractères morphologiques d'une apoptose faisant intervenir une famille de protéases : les caspases (cysteinyl aspartate-specific proteinases). Trois gènes, sans homologues connus chez les mammifères, impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire ont été découverts, *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*) et *grim* (Goyal et al, 2000). Les trois protéines correspondantes RPR, HID et GRIM ont leur domaine N-terminal fortement conservé. L'apoptose induite par ces trois protéines peut être inhibée par les inhibiteurs de caspases comme les protéines de type IAP (inhibitor of apoptosis protein) (McCarthy et Dixit, 1998). Chez les mammifères, la molécule appelée Smac/DIABLO (Verhagen et al, 2000) et la sérine protéase Omi/HtrA2 (Martins et al, 2002) libérées par la mitochondrie peuvent se lier aux IAP et semblent jouer un rôle homologue à ceux de *reaper*, *hid*, et *grim*.

Enfin, les homologues des gènes *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* et *egl-1* impliqués dans la régulation et l'exécution de l'apoptose ont été identifiés chez les mammifères. Ils correspondent chacun à une famille de gènes, ce qui aboutit à une grande diversité d'action de ces molécules pro- ou anti-apoptotiques. Différentes techniques ont permis de déterminer que *ced-3* codait pour une cystéine protéase, soit une protéase homologue à la famille des caspases chez les mammifères, et dont un homologue chez la souris est la cystéine protéase ICE pour « interleukin-1 $\beta$  converting enzyme » (Miura et al, 1993). Le gène *ced-4* chez *C. elegans* a pour homologue *Apaf-1* (apoptotic protease activating factor-1) chez les mammifères (Zou et al, 1997). L'homologue de *Ced-9* chez *C. elegans* est Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2-like) chez les mammifères. Le gène *egl-1* a des homologies fonctionnelles et moléculaires avec les membres de la sous-famille « BH3-only » des protéines de la famille Bcl-2 telles que Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death) ou Bid (BH3 interacting death domain agonist) par exemple (Figure 2).

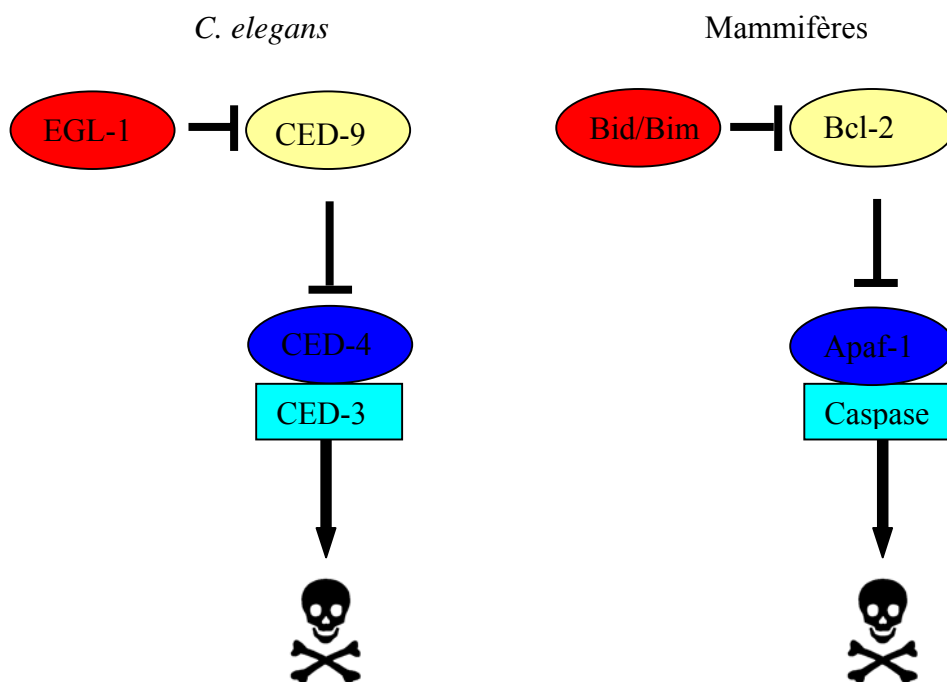


Figure 2 : Les protéines impliquées dans l'apoptose chez *C. elegans* et chez les mammifères (adapté de Couzin et al, 2002).

## 2- Phases et mécanismes généraux de l'apoptose

Les cascades des signaux moléculaires conduisant à l'apoptose, constituent des programmes performants présents dans la plupart, sinon dans toute cellule vivante, que ce soit chez le ver *C. elegans*, la drosophile ou les mammifères. Ces programmes apoptotiques peuvent être initiés par une variété de signaux déclencheurs intra- (physiologiques) ou extra- (stress) cellulaires qui déclenchent une voie parmi plusieurs. Toutes ces voies de transduction du signal apoptotique convergent vers une voie finale effectrice commune de mort cellulaire (Thompson, 1995). C'est l'équilibre entre les gènes pro-apoptotiques et anti-apoptotiques qui déclenche la mort cellulaire.

L'apoptose peut être classiquement décrite en trois phases (Figure 3):

- ✓ une **phase d'initiation** (ou de signalisation ou d'activation) dépendant du stimulus (intra- ou extra-cellulaire, qu'il soit positif ou négatif) déclencheur (ligands des récepteurs de mort cellulaire, privation de facteurs trophiques, perturbation de l'homéostasie calcique...).
- ✓ une **phase de régulation** (ou de décision) basée sur une décision entièrement mitochondriale et contrôlée par les membres de la famille Bcl-2. Durant cette phase la cellule décide d'entrer ou non en apoptose en fonction de son métabolisme interne et de son état de développement.
- ✓ une **phase d'exécution** (ou de dégradation) contrôlée par l'activation de protéases comme les caspases. D'autres protéases telles que les calpaïnes et les cathepsines ou le protéasome peuvent également intervenir. Cette phase entraîne les changements biochimiques et morphologiques du stade final de l'apoptose et les cellules perdent leur viabilité. Quand cette phase débute, la mort est irréversible.

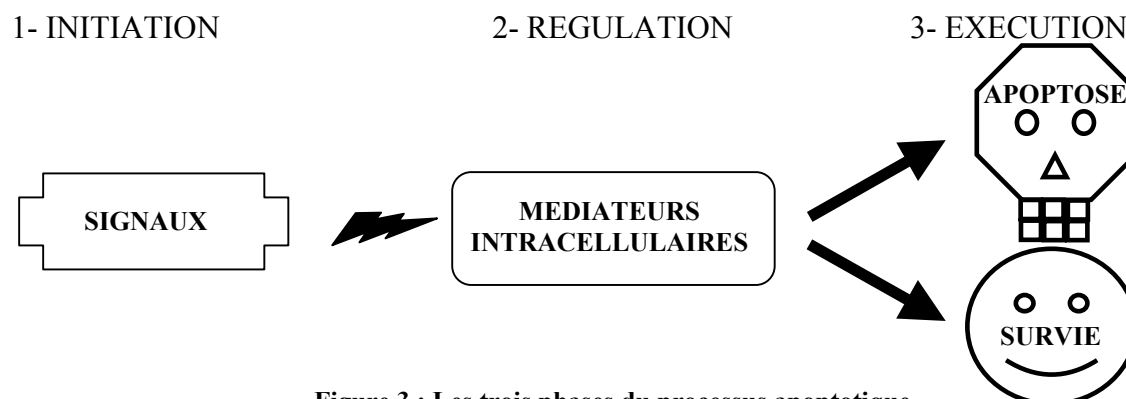


Figure 3 : Les trois phases du processus apoptotique.



Il existe également d'**autres mécanismes** régulant l'apoptose tels que (Figure 4):

- le réticulum endoplasmique (RE), un compartiment cellulaire pouvant aussi déclencher l'apoptose en cas de stress ;
- le suppresseur de tumeur p53, impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome, jouant un rôle important dans le processus apoptotique ;
- les protéines de stress thermique Hsp (**heat shock proteins**).

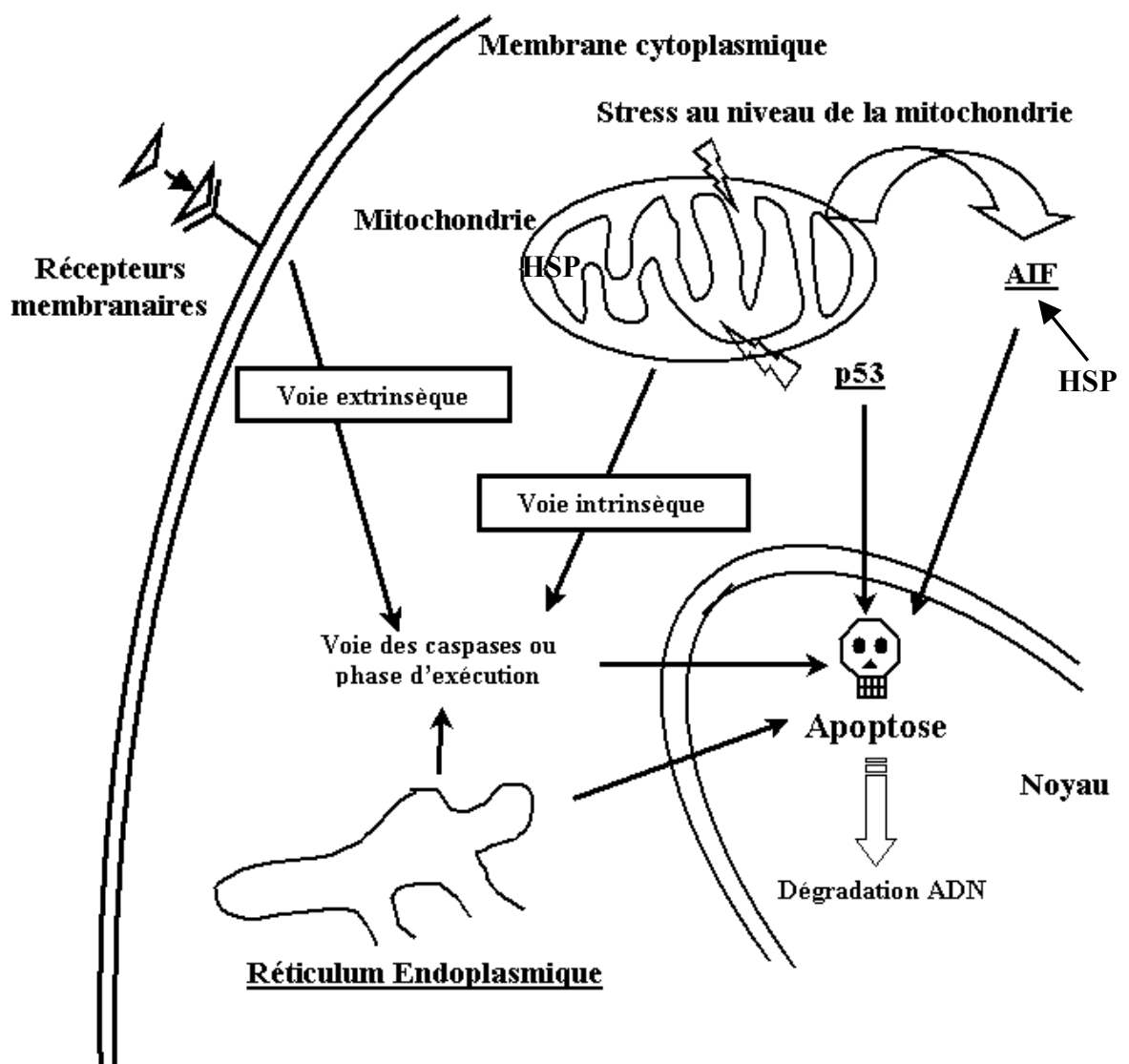


Figure 4 : Représentation schématique des principales voies apoptotiques (d'après Harmand, 2004).

## 2-1 Phase d'initiation

La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra- ou extra-cellulaire) est transmis à des caspases initiatrices par des molécules adaptatrices. Les modifications morphologiques ne sont pas encore visibles et cette phase se caractérise par des modifications biochimiques. Ces dernières dépendent de la nature des stimuli qui peuvent être physiques (pression, micro-ondes, rayonnement X ou UV...), chimiques (étoposide, cisplatine, camptothécine...) ou encore biologiques (ligands de récepteurs membranaires impliqués dans la mort cellulaire...).

Il existe deux principales voies caspases-dépendantes de signalisation de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque). Elles semblent être bien distinctes, cependant la voie des récepteurs de mort peut provoquer l'apoptose par la voie mitochondriale grâce à la protéine Bid, membre de la famille Bcl-2.

### A Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

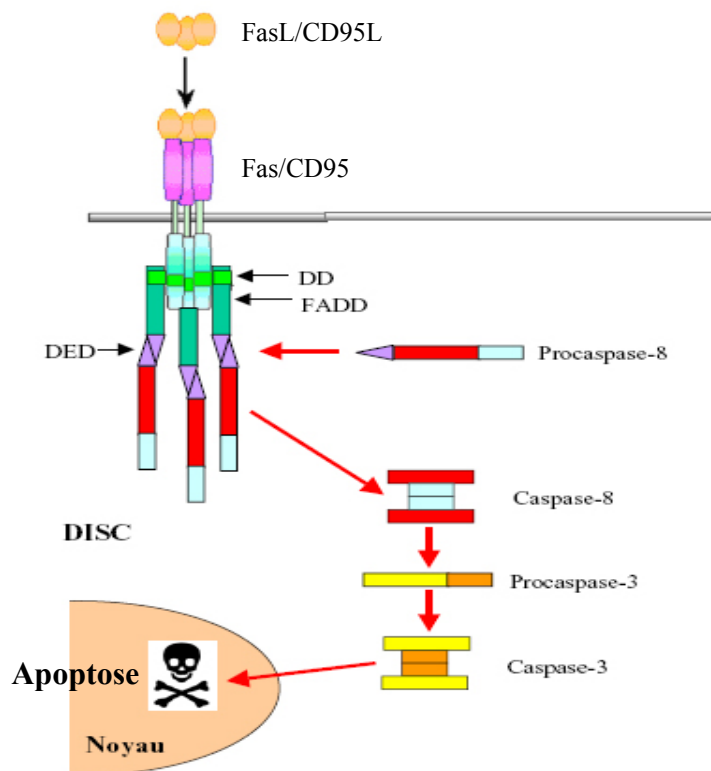
Cette voie est initiée à la surface cellulaire par des liaisons entre des ligands de mort extracellulaires et des récepteurs membranaires spécifiques. Ces récepteurs sont appelés récepteurs de mort (DR : **d**eath **r**eceptors) car la liaison du ligand sur son récepteur déclenche une cascade d'évènements qui entraîne le processus apoptotique. Ces récepteurs possèdent des structures communes permettant de les regrouper dans une seule et même super famille des TNF-R (**t**umor **n**ecrosis **f**actor **r**eceptor) (Nagata, 1997). Certains membres de cette famille ont la particularité de posséder dans leur portion intracellulaire une région conservée appelée « domaine de mort » (DD, **d**eath **d**omain). Cette région est constituée d'un motif protéique d'environ 80 acides aminés nécessaire à la transmission du signal de mort par ces récepteurs. La mort induite par les membres de la famille des TNF-R conduit à l'activation de caspases et en est dépendante (Longthorne et Williams, 1997).

Les ligands de la super famille du TNF sont, par exemple, TNF $\alpha$ , FasL/CD95L (**F**ibroblast-**a**ssociated **L**igand), DR3L (**D**eath **R**eceptor **3** **L**igand) ou TWEAK (**w**eak homologue of **T**NF) ainsi que TRAIL (**T**NF-**R**elated **A**ptosis-**I**nducing **L**igand). Les récepteurs les plus décrits sont TNF-R (**T**umor **N**ecrosis **F**actor-**R**eceptor), Fas (CD95/Apo1), DR3 (**D**eath **R**eceptor **3**, ou appelé aussi Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR6, ainsi que les

deux récepteurs de TRAIL, les molécules DR4 (TRAIL R1) et DR5 (ou Apo2, TRAIL-R2, TRICK2, KILLER) (Kischkel et al, 1995 ; Borner, 2003).

Les ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires avant que leurs domaines extracellulaires soient clivés par des métalloprotéases pour constituer des formes solubles (Tanaka et al, 1995). Les ligands sont produits sous forme de trimères et se lient aux récepteurs TNF-R au niveau du domaine de mort DD intracellulaire. Par conséquent, la mort cellulaire initiée par ces ligands requiert la trimérisation des récepteurs (Figure 5). Ces récepteurs de mort activés par la fixation de leurs ligands recrutent des protéines intracellulaires dites adaptatrices. Ces protéines recrutent, à leur tour, les caspases initiatrices (principalement la caspase-8 et la caspase-10) et induisent leur activation par auto-clivage. Nous avons choisi de présenter le modèle Fas/FasL, modèle le plus connu et le plus décrit. Il joue un rôle important essentiellement dans trois types d'apoptose physiologique : l'élimination des cellules T activées matures pour finir une réponse immunitaire ; l'élimination des cellules cibles, infectées par des virus ou cancéreuses, par les cellules T cytotoxiques et « natural killer » et l'élimination des cellules inflammatoires dans l'œil ou les testicules.

La transmission du signal apoptotique de Fas passe par la formation d'un complexe multiprotéique formé par l'agrégation des récepteurs Fas, la protéine FADD (**F**as-**a**ssociated **d**eath **d**omain) (Kischkel et al, 1995) et la pro-caspase-8. Ce complexe est nommé DISC (**d**eath **i**nducing **s**ignaling **c**omplex). Le rapprochement de la pro-caspase-8 dans le DISC permet le clivage et la libération sous la forme active de la caspase-8 dans le cytosol. Cette dernière va, à son tour, cliver la caspase-3, déclenchant une cascade de caspases effectrices qui vont conduire de façon inéluctable à la mort apoptotique de la cellule (Slee et al, 1999). Il est important de noter que la caspase-8 est essentielle à la mort cellulaire induite par Fas (Varfolomeev et al, 1998).



**Figure 5 : Représentation schématique de la voie d'activation du récepteur Fas/CD95 (d'après Couzinet et al, 2002 et Gupta, 2003). FADD: Fas-associated death domain ; DD: death domain; DED: death effector domain; DISC: death-inducing signalling complex; Fas-L: Fas-Ligand.**

Les travaux récents de Algeciras-Schimmich et collaborateurs en 2002 ont permis de montrer que la fixation de FasL induit la formation de microagrégats de Fas. Ceci permet alors la formation de DISC selon un processus faisant intervenir les filaments d'actine et l'activation de la caspase-8 mais avec trop peu d'efficacité pour la transduction d'un signal apoptotique. L'activation de la caspase-8 permet la formation à la surface cellulaire de larges regroupements membranaires de récepteurs Fas. Ces derniers permettent d'augmenter le signal transmis et d'amplifier l'activation de la caspase-8 pour induire le signal apoptotique. Le complexe Fas/FasL serait alors internalisé grâce à la formation de vésicules d'endocytose par un processus encore mal défini.

## B Voie intrinsèque ou voie mitochondriale

La deuxième voie est induite par des signaux internes comme un stress cellulaire ou une perturbation métabolique, et met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans la cellule. Cette voie est appelée **voie intrinsèque** ou **voie mitochondriale** (Figure 4).

La mitochondrie joue un rôle vital dans la cellule en produisant une grande partie de l'énergie dont la cellule a besoin, en participant à l'homéostasie calcique, en maintenant le potentiel redox et le pH intracellulaire. Ceci signifie qu'un dysfonctionnement majeur de la mitochondrie peut entraîner la mort cellulaire.

Depuis une dizaine d'années, il est maintenant clairement établi que la mitochondrie, organe producteur de l'énergie de la cellule (ATP), joue un rôle clé dans l'apoptose. Son intervention dans ce processus ne s'explique pas par une « simple perte de fonction » ayant pour conséquence un déficit énergétique, mais est reconnue plutôt comme un mécanisme actif s'accompagnant de profondes altérations. On observe une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale - liée à une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) - et la libération dans le cytosol de protéines apoptogènes comme le cytochrome c.

Le mécanisme précis de cette perméabilisation membranaire reste encore très controversé. Plusieurs modèles ont été proposés dont le concept du mégapore mitochondrial appelé PTP (pore de transition de perméabilité) responsable du relargage de facteurs apoptotiques qui a été récemment décrit. La composition exacte du PTP reste encore à élucider. Il se composerait d'un complexe polyprotéique avec des composants localisés dans les deux membranes mitochondriales (externe/interne), dans l'espace intermembranaire et dans la matrice mitochondriale. Dans la membrane interne, on note la présence dans le PTP de la translocase des nucléotides adényliques (ANT). Dans la membrane externe se trouve le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) et il y a, dans la matrice, la cyclophiline D (Cyt-D). Ces protéines coopèrent pour former un pore responsable de la transition de perméabilité membranaire mitochondriale créant un canal qui laisse passer les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1,5 kDa (Marzo et al, 1998 ; Crompton, 1999). L'ouverture de ce canal est régulée à la fois par le potentiel mitochondrial et le pH matriciel. Elle est favorisée par une baisse du  $\Delta\Psi_m$  et une acidification du pH matriciel (Petronilli et al, 1994). L'ouverture de ce canal dans la membrane interne permet un équilibre de l'osmolarité entre la matrice et l'espace intermembranaire, ce qui entraîne une dissipation du gradient de  $H^+$  à travers la membrane interne et le découplage de la chaîne respiratoire. L'ouverture du PTP peut aussi mener à une dérégulation du volume de la mitochondrie qui est due à une hyperosmolarité de la matrice et conduit à une expansion de celle-ci. Puisque la surface de la membrane interne avec ses crêtes est supérieure à celle de la membrane externe, l'expansion

de la matrice provoque une rupture de la membrane externe qui ne peut plus la contenir. Il en résulte une libération de protéines apoptogènes telles que le cytochrome c, certaines procaspases (-2, -3 et -9), les protéines Smac/Diablo localisées dans l'espace intermembranaire qui vont activer les caspases (Ly et al, 2003) ( Figure 6).

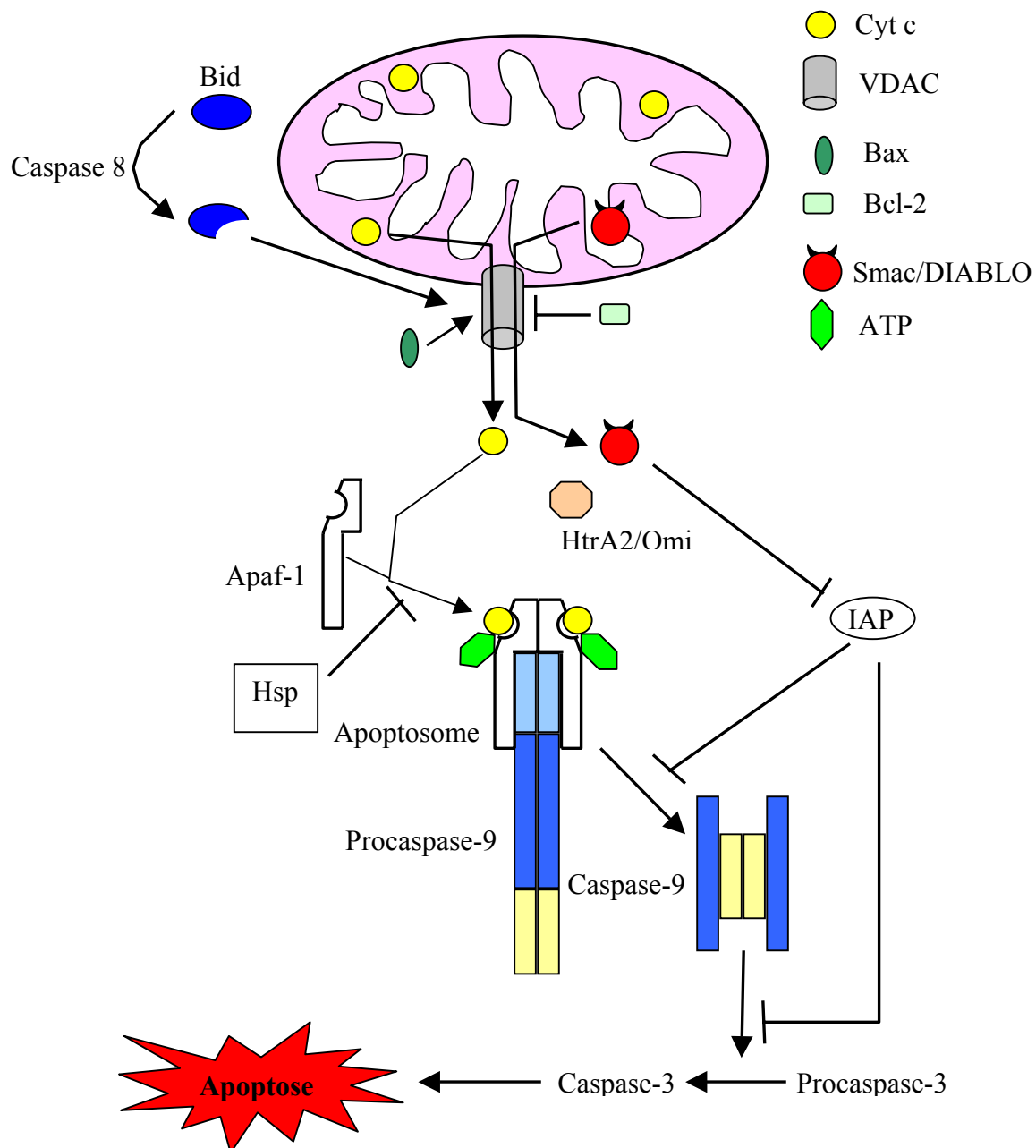


Figure 6 : La voie mitochondriale (d'après Ravagnan et al, 2002).

Les protéines mitochondriales ainsi libérées lors du processus apoptotique sont maintenant regroupées sous le nom générique de SIMP (soluble inter membrane mitochondrial proteins) et possèdent toutes une activité pro-apoptotique. Elles sont associées

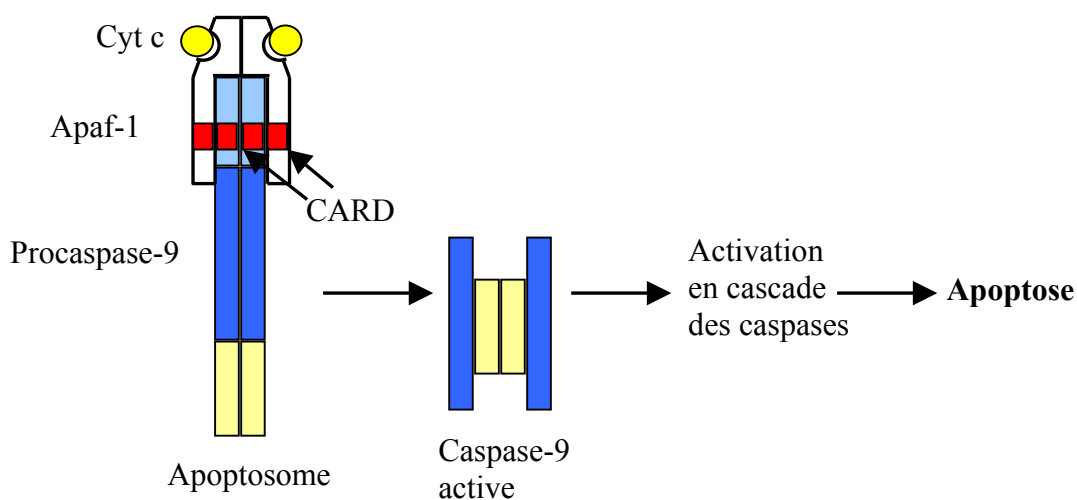
soit à une voie mitochondriale caspase-dépendante, soit à une voie mitochondriale caspase-indépendante.

- **La voie mitochondriale dépendante des caspases**

Une première classe de SIMP agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases. Parmi cette classe de SIMP on distingue des pro-caspases, le cytochrome c et un répresseur d'inhibiteur de caspases, la protéine Smac/DIABLO. Le cytochrome c est synthétisé dans le cytosol sous la forme d'apo-cytochrome c puis est transloqué à travers la membrane externe mitochondriale. Il est ensuite transformé en un holo-cytochrome c suite à son attachement à un noyau hème. Pendant longtemps, son rôle n'a été attribué qu'à sa participation à la phosphorylation oxydative comme transporteur d'électrons (Ravagnan et al, 2002). Ce n'est que depuis les années 90 que son rôle dans l'exécution de la mort cellulaire programmée a été clairement démontré (Zhivotovsky et al, 1998). Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec l'homologue de CED-4, la protéine Apaf-1 et la forme zymogène de la caspase-9 *via* des domaines CARD (**c**aspase **r**ecruitment **d**omain), formant ainsi, en présence d'ATP, un complexe multiprotéique appelé apoptosome à l'origine du clivage (et donc de la formation de la forme active) de la pro-caspase-9 (Zou et al, 1999). Cette dernière activera à son tour d'autres caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7 (Figure 7). De plus, des études ont confirmé l'importance cruciale du cytochrome c dans l'apoptose en invalidant le gène codant pour cette protéine. Ces études montrent qu'aucune autre protéine cellulaire ne peut remplacer le cytochrome c pour l'oligomérisation d'Apaf-1 et pour l'activation de la caspase-3, induite par un stress cellulaire ou par un agent ciblant la mitochondrie (Li et al, 2000a).

Dans les cellules où le cytochrome c est présent en excès, un pool active les caspases, et un pool reste arrimé à la mitochondrie pour maintenir le transfert d'électron et par conséquent la production d'ATP nécessaire à la formation de l'apoptosome (Martinou et al, 2000). Dans ces conditions, la synthèse d'ATP continue et les caspases peuvent opérer et réaliser l'exécution de la cellule par apoptose par la voie Apaf-1 dépendante. La protéine Apaf-1 (environ 130 kDa) comprend un domaine CARD dans la partie amino-terminale, une région ayant une forte homologie avec Ced-4 et un domaine C-terminal contenant plusieurs répétitions WD-40 (40 répétitions tryptophane/acide aspartique) impliquées dans les interactions protéines-protéines (Cain et al, 2002). Les répétitions WD-40 sont nécessaires à

la liaison au cytochrome c mais ne sont pas suffisantes. Le domaine WD joue également un rôle important dans le recrutement de la procaspase-3. Le domaine CARD d'Apaf-1 n'est pas exposé dans des conditions normales et ne peut donc pas interagir avec la caspase-9 ; en revanche en présence d'ATP et de cytochrome c, Apaf-1 change de conformation et peut interagir avec la caspase-9 grâce à l'exposition de CARD (Li et al, 1997) (Figure 6, Figure 7). La partie centrale homologue à Ced-4 possède un domaine semblable à un domaine ATPase et l'hydrolyse de l'ATP paraît être nécessaire à la formation de l'apoptosome qui est un complexe protéique d'une taille importante (700 kDa) (Hu et al, 1999).



**Figure 7 : Représentation schématique de la formation de l'apoptosome.**

Cependant, la libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome ne sont pas les seuls mécanismes qui aboutissent à l'activation des caspases. En effet, la protéine mitochondriale Smac/DIABLO synthétisée sous la forme d'un précurseur de 29 kDa, devient après protéolyse une protéine mature de 23 kDa, qui peut alors être libérée en réponse à un stimulus apoptotique (Verhagen et al, 2000). Elle se lie sous forme de dimère aux protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs : **i**nhibitors of **a**poptosis) et les inactive contribuant ainsi à l'activation des caspases (voir paragraphe II-2-3-C).

- **La voie mitochondriale indépendante des caspases**

Plusieurs protéines contenues dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie peuvent induire l'apoptose directement sans activation des caspases.



C'est le cas du facteur d'induction apoptotique AIF (**apoptosis inducing factor**), seul représentant d'une autre classe de SIMP, qui est une flavoprotéine présentant des homologies avec des enzymes de type oxydoréductase de plantes ou de bactéries (Ameisen, 2002). Ce facteur est synthétisé dans le cytosol, sous la forme d'un précurseur de 67 kDa dont la partie N-terminale contient un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois introduit dans l'espace intermembranaire mitochondrial, il est clivé et libère une protéine mature de 57 kDa. Cette protéine a une double fonction de NADPH oxydase et monodéhydroascorbate réductase mitochondriale et, de facteur apoptogène (Mate et al, 2002). Il faut noter que son activité oxydoréductase n'est pas essentielle à sa fonction apoptotique. Après exposition de la cellule à un stimulus pro-apoptotique, l'AIF est transloqué de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. Il induit alors, en coopération avec des endonucléases (notamment l'endonucléase G), d'une manière indépendante des caspases, le clivage de l'ADN par la fragmentation de la chromatine en particules de haut poids moléculaire de 50 kpb (Susin et al, 1999).

L'endonucléase G est une endonucléase mitochondriale codée par le génome nucléaire. Son implication dans la réplication du génome mitochondrial est son rôle principal. Durant l'apoptose des cellules de mammifères, l'endonucléase G est relarguée par la mitochondrie et transloquée vers le noyau où elle digère l'ADN nucléaire (van Loo et al, 2001).

Enfin, nous pouvons citer la protéase Omi (ou HtrA2) qui est une sérine protéase de 49 kDa, homologue de l'endoprotéase bactérienne HtrA2 (Faccio et al, 2000). Elle est synthétisée dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur de 49 kDa qui porte en position N-terminale un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois introduite dans l'espace intermembranaire mitochondrial, elle est clivée et libère une protéine mature de 37 kDa (Savopoulos et al, 2000). Après exposition de la cellule à un stimulus apoptotique, Omi/HtrA2 est libérée dans le cytosol et peut ainsi induire une mort soit dépendante soit indépendante des caspases. Cette protéine peut soit se lier et inhiber les IAPs déclenchant alors la cascade de caspases, soit dégrader, grâce à son activité de sérine protéase, des protéines intracellulaires nécessaires à la vie de la cellule (van Loo et al, 2002).

## C Interconnexion entre les voies intrinsèque et extrinsèque

L'importance de la voie mitochondriale a été récemment démontrée dans la mort induite par le récepteur Fas (Fulda et al, 1998). Un membre de la famille Bcl-2, la protéine Bid (Luo et al, 1998), constitue un des liens entre la voie du récepteur Fas et la voie mitochondriale (Li et al, 1998) (Figure 8). Un fragment de la protéine Bid, issu du clivage par la caspase-8, est transféré du cytosol à la mitochondrie. En effet, Bid tronqué (tBid), en se liant à Bax (**B**cl-2 **a**ssociated **X** protein), un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 présent sous forme monomérique dans le cytosol, induit l'oligomérisation de ce dernier et son intégration dans la membrane externe mitochondriale. Ce phénomène entraîne l'ouverture de mégapores mitochondriaux à l'origine de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de la libération du cytochrome c (Eskes et al, 2000) induisant l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3. La protéine Smac/Diablo et l'AIF (facteurs apoptogènes) sont également relargués.

Une autre protéine faisant la jonction entre les deux voies a été identifiée. Il s'agit de la protéine régulatrice BAR (**b**ifunctional **a**poptosis **r**egulator) (Zhang et al, 2000) qui possède la capacité de s'associer à la fois aux molécules anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> *via* un domaine d'interaction protéine-protéine SAM (**s**terile-**a**lpha **m**otif) et à la caspase-8 (*via* un domaine DED-like).

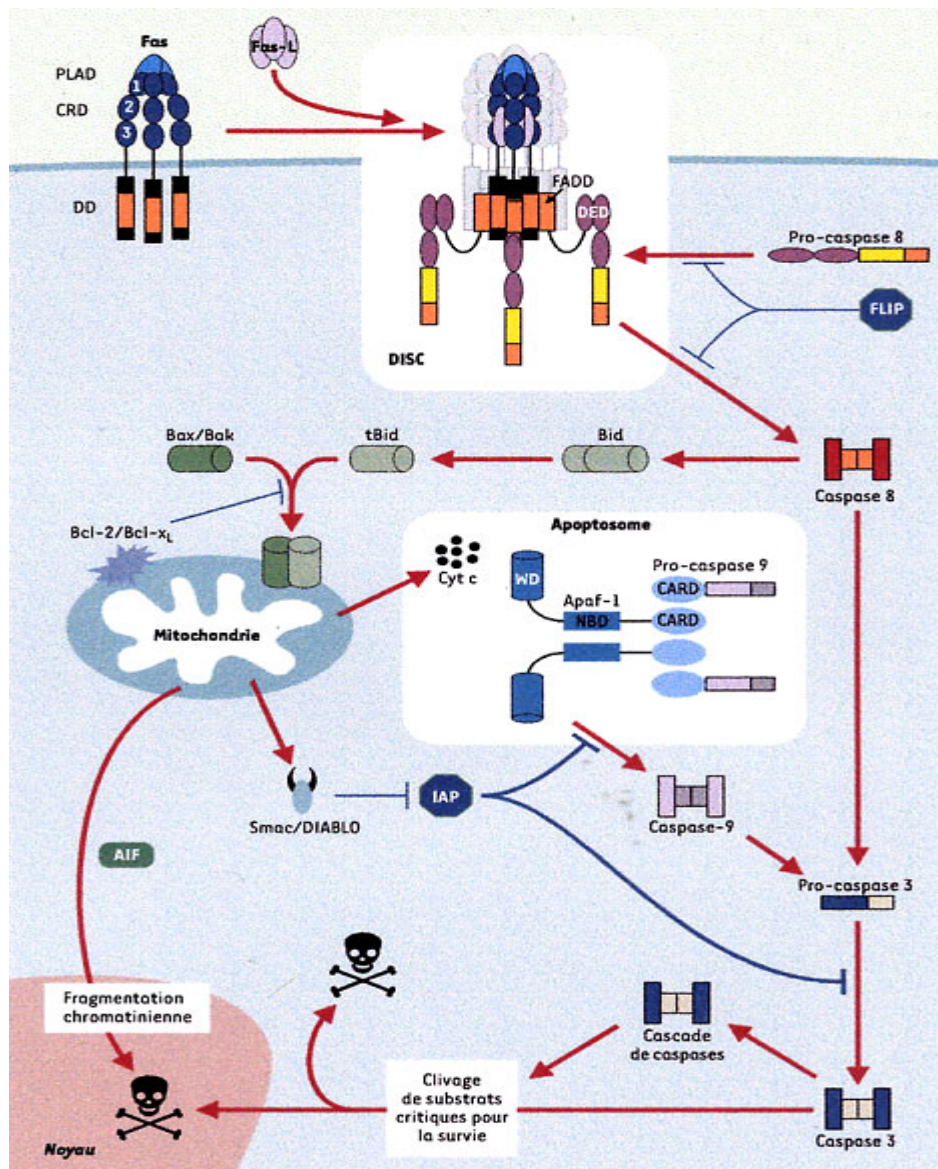


Figure 8 : Schéma général représentant les deux voies principales de déclenchement de la mort cellulaire (D'après Couzinet et al, 2002). FADD: Fas-associated death domain ; DD: death domain; DED: death effector domain; DISC: death-inducing signalling complex; Fas-L: Fas-Ligand; CARD: Caspase Recruitment Domain; NBD: nucleotide binding domain; FLIP: FADD-like ICE inhibitory proteins; AIF: apoptosis inducing factor; IAP: inhibitors of apoptosis; WD: 40 répétitions tryptophane/acide aspartique.

## 2-2 Phase de régulation par les protéines de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 (homologue du gène *ced-9* de *C. elegans*) ont une grande importance dans la phase de régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire (voie intrinsèque et voie extrinsèque). Le plus souvent, les signaux inducteurs d'apoptose semblent être modulés par les gènes de cette famille. Cette modulation se situe en

amont de l'activation de la phase exécutive faisant intervenir les caspases. Le proto-oncogène Bcl-2 a été le premier membre découvert dans les lymphomes folliculaires de type B (Tsujimoto et Croce, 1986). La translocation chromosomique t(14 ; 18) associée à ces lymphomes a permis d'isoler le gène *bcl-2*, localisé au point de cassure de la translocation (Vaux et al, 1988). Bien qu'initialement un rôle dans la survie ait été attribué à Bcl-2, l'inactivation du gène chez la souris a permis d'aller plus loin dans la compréhension de sa fonction anti-apoptotique. Le blocage du gène aboutit à une variété d'anomalies attribuées pour la plupart à un dérèglement de l'apoptose, notamment une mort cellulaire excessive (Nakayama et al, 1994). Après la découverte de Bcl-2, de nombreuses protéines présentant des similitudes avec Bcl-2 ont été mises en évidence. Cette famille Bcl-2 regroupe à la fois des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bcl-X<sub>S</sub>, etc ...) et des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Bcl-B, etc ...). L'équilibre entre ces deux types de protéine détermine en partie la susceptibilité des cellules à l'apoptose.

### A Classification des protéines de la famille Bcl-2

Tous les membres de la famille Bcl-2 possèdent au moins un des quatre domaines d'homologie de Bcl-2: BH1, BH2, BH3 et BH4 (BH, **Bcl-2 homology**). Le domaine BH3 joue un rôle dans la dimérisation ainsi que dans l'induction de l'apoptose. Presque toutes les protéines de la famille Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire (TM) carboxy-terminal leur permettant de s'ancrer dans des membranes cellulaires. Ces membres sont classés en deux groupes, l'un anti-apoptotique et l'autre pro-apoptotique qui se scinde lui-même en deux sous-groupes (Borner, 2003).

Le premier groupe « **Bcl-2-like survival factors** » comprend les membres anti-apoptotiques avec notamment Bcl-2, Bcl-W, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, A1. Ils contiennent quatre domaines BH, dont le domaine BH4 spécifique et absolument essentiel à la fonction de survie.

Le deuxième groupe contient les membres pro-apoptotiques et se divise en deux sous-groupes. Le premier sous groupe « **Bax-like death factors** » se caractérise par l'absence du domaine BH4 dans la séquence des protéines (Bax, Bak, Bok...). Le deuxième sous-groupe « **BH3-only death factors** » comprend des membres possédant uniquement un domaine BH3 considéré comme un signal de mort (Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Noxa, Puma...).

## B Mécanismes d'action des protéines de la famille

### Bcl-2

Les membres anti- et pro-apoptotiques semblent avoir des localisations sub-cellulaires différentes. Les membres anti-apoptotiques siègent au niveau des membranes cellulaires des mitochondries, du noyau et du RE (reticulum endoplasmique) *via* leur domaine TM (Wattenberg et Lithgow, 2001). Les protéines pro-apoptotiques auraient, quant à elles, une localisation cytosolique (Kaufmann et al, 2003). Un des mécanismes d'action des protéines de la famille Bcl-2 est l'hétérodimérisation entre les membres pro- et anti-apoptotiques, suggérant la neutralisation compétitive entre eux. Le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule détermine sa sensibilité à un signal de mort. Bien que certaines protéines de la famille Bcl-2 soient ancrées dans les membranes où elles sont directement actives, d'autres ont besoin d'un second niveau de régulation pour être transloquées dans la cellule et exercer leur fonction.

Ces mécanismes régulateurs correspondent à des changements conformationnels et/ou à des modifications post-traductionnelles (Puthalakath et Strasser, 2002). En effet, l'activation ou l'inactivation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont régulées par de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que les phosphorylations-déphosphorylations, le clivage ou la séquestration dans le cytoplasme (Borner, 2003). Plusieurs exemples illustrent ce processus. A la suite d'un signal apoptotique, les molécules anti-apoptotiques, telles que Bax, changeraient de conformation afin de permettre l'exposition de leur domaine TM et de rendre possible leur ancrage sous forme d'homodimère au niveau de la membrane externe mitochondriale. Ceci induirait la perméabilisation de cette dernière, modulant ainsi la libération des facteurs apoptogènes (Suzuki et al, 2000). Un mécanisme similaire est mis en évidence pour Bcl-x<sub>L</sub> (Hinds et al, 2003). En réponse à un stimulus apoptotique, l'expression des protéines Noxa ou Bim est induite et serait régulée par p53. Bad, Bid ou Bmf subissent des clivages et/ou des modifications post-traductionnelles du type phosphorylation (Borner, 2003). En réponse à l'activation des récepteurs de mort, la protéine Bid est clivée par la caspase-8 générant la protéine tronquée (tBid) qui peut être transloquée et s'ancrer à la mitochondrie. Cette forme tronquée serait indispensable au relargage du cytochrome c et tBid s'associerait alors à Bax par son domaine BH3 pour causer le dysfonctionnement de la mitochondrie. De même, la protéine Bad est régulée par une variété de kinases. Ces kinases peuvent la phosphoryler sur différents résidus sérines et contrôler

ainsi son interaction ou non avec la protéine chaperonne 14-3-3 et par conséquent commander sa séquestration dans le cytosol (Harada et al, 1999). A la suite de signaux apoptotiques, Bad est déphosphorylée pour former des hétérodimères avec Bcl-X<sub>L</sub> ou Bcl-2, par liaison avec son domaine BH3. Seule la forme non phosphorylée de Bad est capable de lier Bcl-X<sub>L</sub> (Fang et al, 1999). D'autres membres pro-apoptotiques sont séquestrés par des éléments du cytosquelette. En effet, les molécules pro-apoptotiques Bim et Bmf sont essentielles à l'apoptose durant l'embryogénèse. Leur inactivation est due à leur séquestration par des protéines du cytosquelette comme la dynéine. A la suite d'un signal de mort, Bim et Bmf sont relarguées dans le cytosol et se lient à la mitochondrie pour interagir avec d'autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Borner, 2003).

### ***2-3 Phase d'exécution par les caspases***

La phase d'exécution se caractérise par un phénomène en cascade d'évènements enzymatiques qui amplifie la réponse de la cellule par rapport au stimulus initial. La plupart des modifications morphologiques observées dans les cellules apoptotiques résulte de l'activation de la cascade des caspases.

Elles ont un rôle primordial dans l'exécution de l'apoptose. Le terme caspase a été proposé par Alnemri et collaborateurs (1996). Les caspases sont des cystéines protéases qui coupent après un résidu aspartyl ; le « C » représente la cystéine du site actif et « aspase » définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique.

Les caspases sont hautement conservées au cours de l'évolution ; on les retrouve chez les mammifères, ainsi que chez les insectes et chez le nématode *C. elegans* (Budihardjo et al, 1999 ; Earnshaw et al, 1999). Le gène homologue de *ced-3* chez les mammifères code pour la protéine ICE (interleukin-1  $\beta$  converting enzyme), renommée caspase-1. Il existe 14 caspases différentes dont le poids moléculaire varie de 32 à 55 kDa. A l'exception des caspases-11 et -13 elles existent toutes chez l'homme (Le blanc, 2003).

## A Structure et activation des caspases

Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes ou pro-caspases. Les caspases sont constituées d'un pro-domaine de taille et de séquence variables localisé dans la partie N-terminale de la protéine, d'une grande sous-unité (20 kDa) située au milieu de la molécule et portant un motif conservé QACxG et d'une petite sous-unité (10 kDa) localisée dans la partie C-terminale. Certains membres de la famille des caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité. (Thornberry, 1998) (Figure 9).

L'activation des caspases nécessite le clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de deux sites consensus, permettant de couper le pro-domaine et de séparer les deux sous-unités. Les caspases peuvent s'autocliver et activer d'autres caspases ou substrats formant alors une cascade enzymatique permettant d'amplifier et d'intégrer les signaux pro-apoptotiques (Thornberry, 1998). Les deux sites consensus diffèrent selon les caspases mais le clivage se fait toujours après la liaison Asp-X (où X est un amino-acide variable) (Figure 9). L'activation des caspases nécessite toujours un clivage en deux étapes successives, libérant d'abord la petite sous-unité puis la grande. Bien que la grande sous-unité contienne le domaine catalytique, son activité dépend de la liaison à la petite sous-unité formant un hétérodimère. Un tétramère se forme, constitué par l'association de deux hétérodimères, contenant deux sites catalytiques indépendants QACxG (Budihardjo et al, 1999).

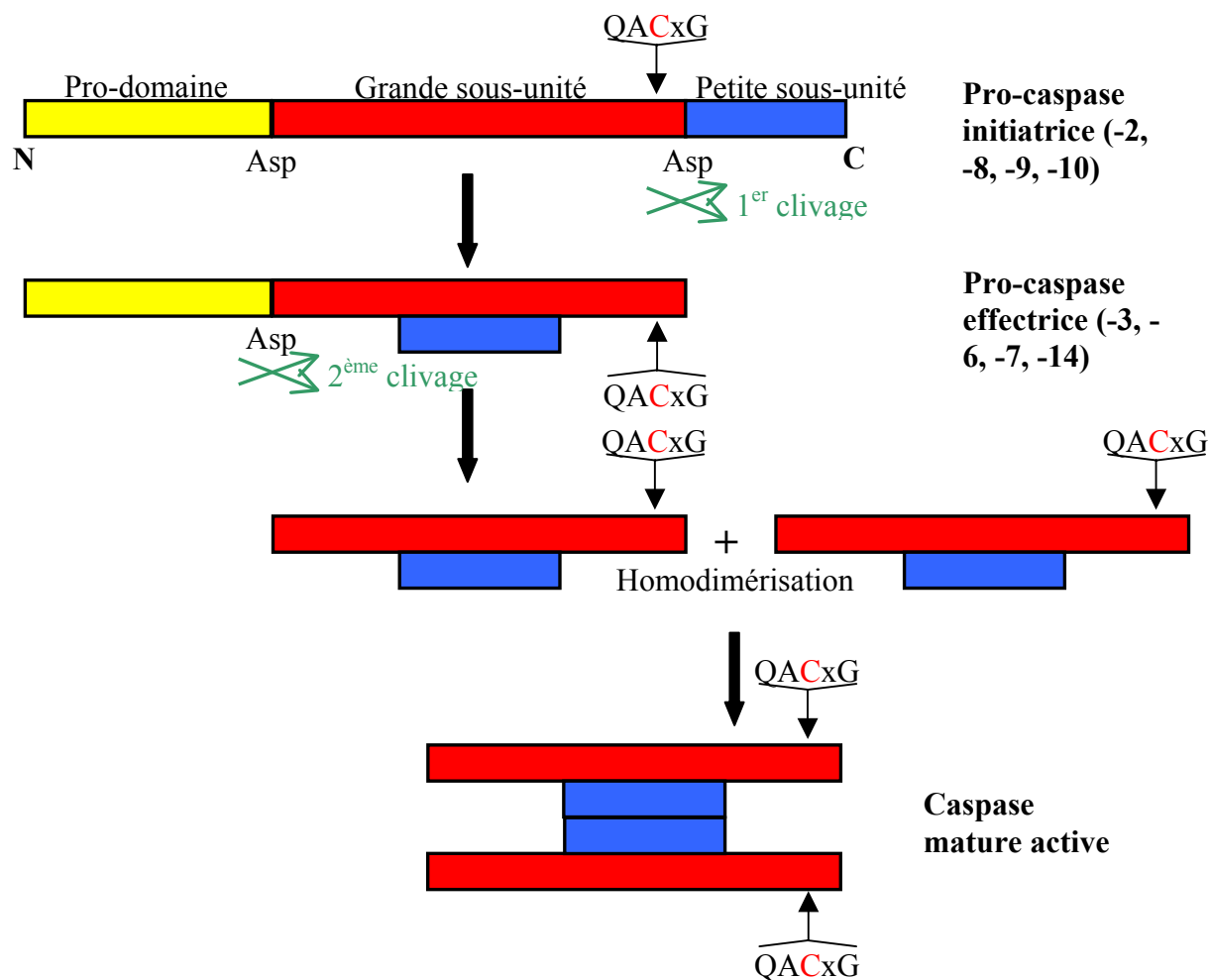


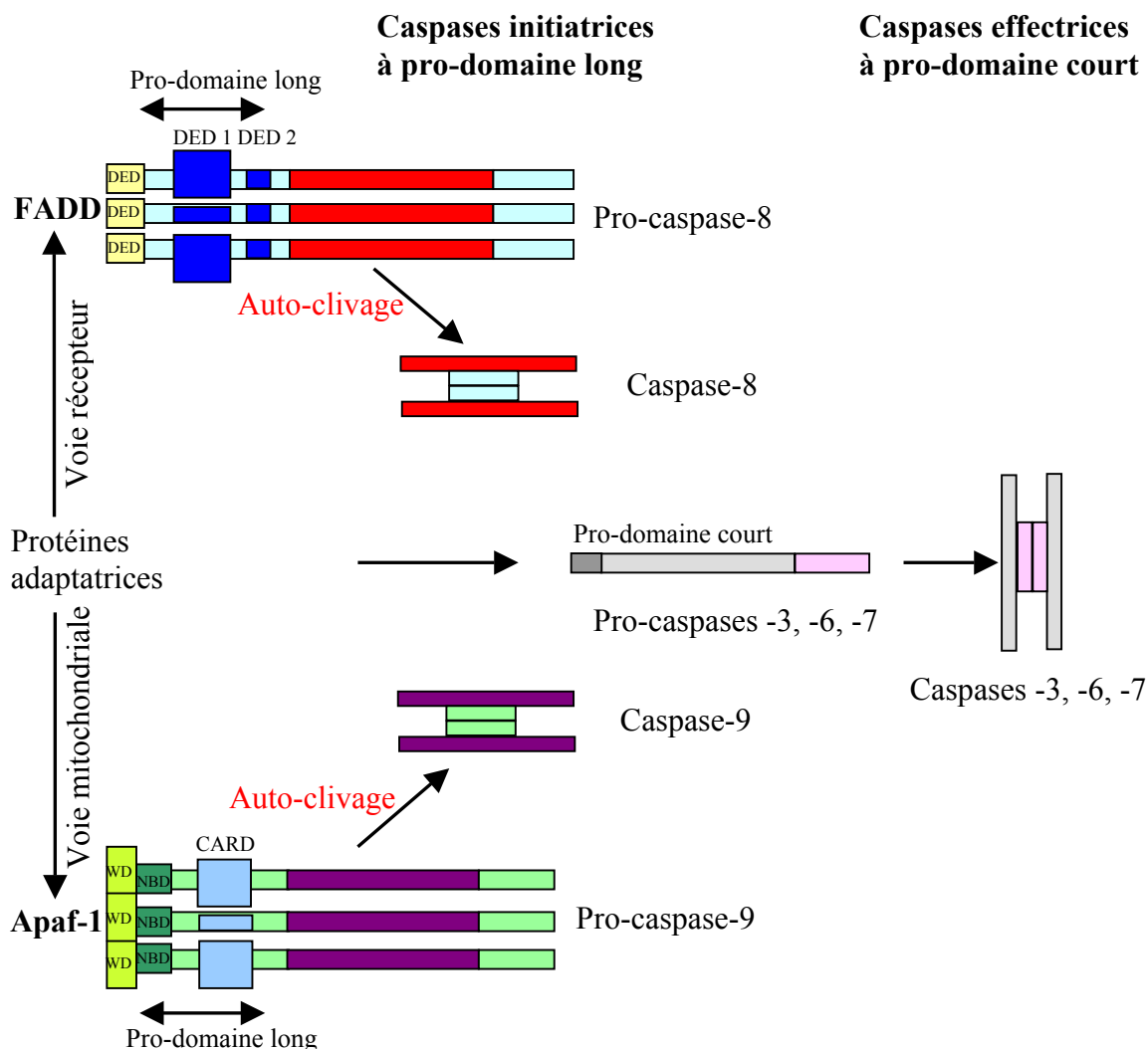
Figure 9 : Mécanisme général d'activation des caspases (d'après Couzinet et al, 2002).

## B Les différentes classes de caspases

On distingue deux types de caspases différentes. En effet, toutes les caspases ne sont pas des molécules effectrices du processus de mort. Seules les caspases-3, -6, -7, -11 et -14 ayant un pro-domaine court sont directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose alors que les caspases -1, -2, -4, -5, -8, -9, et -10 et -12 à pro-domaine long sont des molécules initiatrices ou régulatrices (Figure 9, Figure 10). Ces dernières fonctionnent comme des molécules de signalisation. Elles sont recrutées au niveau de complexes protéiques par l'intermédiaire de leur pro-domaine et sont capables par autoactivation de transduire le signal et d'activer les caspases effectrices. Il est désormais connu que les caspases-8 et -10 sont activées par la voie des récepteurs de mort alors que la caspase-9 est activée par la voie apoptotique mitochondriale (Gupta, 2003). Cette différence dans le rôle des caspases est liée à



la présence de motifs d'interactions protéines-protéines, tels que les domaines DED pour «death effector domain» (caspase-8 et -10) ou CARD (caspase-1, -2, -4 et -9) au niveau du pro-domaine. En effet, les caspases-8 et -10 contiennent des DED capables de se lier par liaison homophile à d'autres DED présents sur des molécules adaptatrices. Le domaine CARD contenu dans les pro-domaines des caspases-1, -2, -4 et -9 leur permet de la même manière de s'associer à d'autres caspases ou à d'autres molécules adaptatrices. Ces motifs leur permettent d'interagir avec des protéines telles que FADD ou Apaf-1, ce qui conduit finalement à leur clivage (Figure 10). Les caspases effectrices se situent en aval dans le processus apoptotique. Leur activation par les caspases initiatrices aboutit à un fonctionnement dit en cascade, conduisant à la dégradation d'un grand nombre de protéines nécessaires à la vie de la cellule (Earnshaw et al, 1999). Le rôle déterminant des caspases dans le développement embryonnaire et dans la mort cellulaire programmée qu'elles initient, a été confirmé dans les modèles murins d'inactivation génique. Les souris invalidées pour le gène caspase-3 sont plus petites que les souris sauvages et meurent entre la première et la troisième semaine après la naissance. Les souris invalidées pour le gène de la caspase-9 meurent au 16<sup>ème</sup> jour de développement et souffrent de malformations cérébrales (Los et al, 1999). La caspase-12 a été récemment décrite comme la caspase médiant l'apoptose à partir d'un stress au niveau du réticulum endoplasmique (Oyadomari et al, 2002).



**Figure 10 : Les caspases initiatrices et effectrices (Adapté de Couzinet et al, 2002).** FADD: Fas-associated death domain ; DED: death effector domain ; Apaf-1: Apoptotic protease activating factor-1 ; WD: 40 répétitions tryptophane/acide aspartique; NBD: nucleotide binding domain; CARD: caspase recruitment domain.

### C Principaux substrats et inhibiteurs des caspases

Les caspases clivent de nombreuses protéines à l'origine de la plupart des événements morphologiques, structuraux ou biochimiques de l'apoptose. Ces substrats regroupent un large éventail de protéines cellulaires : cytoplasmiques (actine,  $\beta$ -caténine...), nucléaires (lamine A et B, Mdm2...), des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN (PARP, ARN polymérase I, ADN topoisomérase I...), des protéines kinases (PKC, MAP/ERK kinases...), des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et la prolifération (p27<sup>Kip1</sup>, pRB...) ainsi que des protéines dont le clivage a un rôle direct dans l'apoptose (caspases, protéines de la famille Bcl-2) (Earnshaw et al, 1999).

L'activation en cascade des caspases permet l'amplification du signal initial. Le clivage du substrat, induit par la caspase, inactive principalement la protéine cible, mais il peut aussi l'activer en clivant un domaine régulateur négatif ou en inactivant une sous-unité régulatrice de ce substrat (Hengartner, 2000).

L'un des mécanismes les plus étudiés est l'activation des nucléases conduisant à la fragmentation de l'ADN. Ces nucléases portent le nom de DFF (facteur de fragmentation de l'ADN) chez l'homme et CAD (caspase **act**ivated-**D**nase) chez la souris. Elles existent dans la cellule sous forme de complexe inactif car elles sont liées à une sous-unité inhibitrice. La nucléase DFF40 est complexée à la protéine inhibitrice DFF45 chez l'homme. Chez la souris CAD est complexée à ICAD. L'activation de ces endonucléases se produit pendant l'apoptose par clivage de la sous-unité inhibitrice par la caspase-3. L'endonucléase ainsi libérée génère des fragments d'ADN de 180 paires de base (Samejima et al, 2001).

Certains membres de la famille Bcl-2 peuvent également être clivés pour être activés, c'est le cas de la protéine Bid clivée par la caspase-8 dans certaines conditions (Li et al, 1998 ; Luo et al, 1998).

D'autres événements comme le clivage des lamines par les caspases expliquent la condensation nucléaire observée au cours de l'apoptose (Buendia et al, 1999). La perte de la morphologie cellulaire est probablement la conséquence du clivage de protéines du cytosquelette telles que la fodrine et la gelsoline (Kothakota et al, 1997) ou encore l'actine ou la protéine tau entraînant une réorganisation de l'architecture cellulaire (Levee et al, 1996). L'apparition de bourgeonnements membranaires semble être provoquée par le clivage de PAK-2 (**p**21-**act**ivated **k**inase) au niveau de la sous-unité régulatrice et au niveau de la sous-unité catalytique, permettant ainsi son activation (Rudel et Bokoch, 1997) (Figure 9). Près de cent substrats de caspases ont été identifiés jusqu'alors indiquant la complexité du phénomène de mort par apoptose.

Un autre substrat également très étudié est la poly (ADP-ribose) polymérase ou PARP (Dantzer et al, 1999). Cette protéine enzymatique est constituée d'un domaine N-terminal de liaison à l'ADN contenant deux motifs en doigts de zinc, un domaine central et un domaine C-

terminal catalytique. Dans des conditions normales, l'enzyme inactive réside dans le nucléoplasme et, en réponse à des lésions sur l'ADN, la protéine PARP est recrutée. Elle devient active en se liant à l'ADN et permet alors la réparation de l'ADN en synthétisant de longs polymères d'ADP-ribose. La PARP semble jouer un rôle important au cours de l'apoptose. En effet, la PARP est clivée par des protéases telles que les caspases-3, -7 ou -9, ce qui sépare le domaine de liaison à l'ADN du domaine catalytique (D'Amours et al, 1999). Le domaine de liaison à l'ADN peut par conséquent, en se fixant sur l'ADN, empêcher toute autre réparation.

Les protéines anti-apoptotiques membres de la famille Bcl-2, FLIP (**FLICE Inhibitory Protein**) et IAP sont des inhibiteurs des caspases dans les cellules de mammifères.

Les IAP ont été décrites dans les génomes de baculovirus (Crook et al, 1993). Cette découverte a permis d'identifier deux motifs conservés dans les IAP : un domaine (répété 1 à 3 fois) appelé BIR (**Baculovirus IAP Repeat**) et un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc nommé RING (« RING finger »). Toutes les IAP possèdent le domaine BIR qui est essentiel à leurs propriétés anti-apoptotiques (Hinds et al, 1999) alors que seules quelques-unes des IAP possèdent un domaine RING. Chez l'homme huit IAP ont été identifiées et seulement cinq contiennent le domaine RING à savoir NAIP, cIAP-1, cIAP2, XIAP et la survivine (Liston et al, 1996) (Figure 11). XIAP (**X-linked IAP**) est le membre le mieux caractérisé. Les IAP agissent soit en bloquant l'activation des pro-caspases, soit en inhibant l'activité des caspases matures. Enfin, l'activité des IAP ne semble pas se limiter à l'inhibition des caspases car elles interviendraient dans la régulation du cycle cellulaire et dans des cascades de signalisation caspases-indépendantes (Levkau et al, 2001). Il faut noter que la protéine Smac/Diablo est un inhibiteur des IAP. Au cours de l'apoptose, la protéine Smac/Diablo est libérée de la mitochondrie et se lie aux IAP qui ont pour rôle d'empêcher l'activation de la caspase-9. Cette fixation de Smac/Diablo sur IAP permet le bon déroulement de l'apoptose avec l'activation de la caspase-9 (Ravagnan et al, 2002).

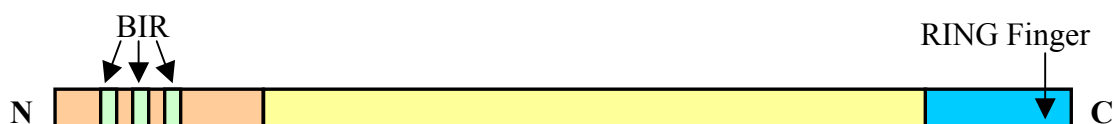


Figure 11 : Structure schématique de la protéine IAP (d'après Liston et al, 1996).

La protéine FLIP régule le recrutement, par les récepteurs de mort, de la procaspase-8 (Irmeler et al, 1997). Cette protéine contient deux domaines effecteurs de mort cellulaire (DED) qui lui permettent de se lier aux pro-domaines des caspases-8 ou -10 et ainsi empêchent leur recrutement par les récepteurs de mort, notamment les récepteurs TNF-R1 et Fas/CD95 (Okano et al, 2003). FLIP a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose (Irmeler et al, 1997 ; Srinivasula et al, 1997) ou induire l'apoptose (Han et al, 1997; Shu et al, 1997) selon le type cellulaire considéré. Cependant, dans des conditions physiologiques, FLIP semble fonctionner comme un inhibiteur de la pro-caspase-8 et serait un important médiateur de NF- $\kappa$ B, protéine contrôlée par des signaux anti-apoptotiques (Micheau et al, 2001).

#### D Autres protéases impliquées dans l'apoptose

D'autres protéases en dehors des caspases jouent un rôle dans diverses formes d'apoptose. Il s'agit du granzyme B, de la Cathepsine D, du protéasome et des calpaïnes.

**Le granzyme B** est une sérine estérase qui peut activer plusieurs membres de la famille des caspases (Greenberg, 1996). Les lymphocytes T cytotoxiques induisent l'apoptose en libérant le granzyme B et la perforine. La perforine est essentielle dans ce processus, car son activité est requise pour former des pores dans la membrane des cellules cibles. Ces pores permettent au granzyme B d'entrer dans la cellule et d'y amorcer l'apoptose. *In vitro*, le granzyme B est capable d'activer directement les caspases-3 et -9 (Anel et al, 1997).

**La cathepsine D** est une aspartate protéase qui peut être impliquée dans l'apoptose induite par l'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), par le TNF ou par Fas/Apo-1 (Deiss et al, 1996). Elle a une activité protéolytique sur les protéines d'endocytose lysosomiale. La pepstatine A, un inhibiteur spécifique des aspartates-protéases réduit l'apoptose induite par l'INF- $\gamma$ , par le TNF ou par Fas/Apo-1.

**Les calpaïnes** sont des cystéines protéases cytosoliques activées par l'augmentation du calcium (Di Rosa et al, 2002). Elles sont impliquées dans la mort cellulaire dans différents modèles cellulaires (Liu et al, 2001 ; Harriman et al, 2002), ainsi que dans l'apoptose neuronale. Parmi leurs substrats, on retrouve des protéines du cytosquelette (comme la

protéine tau), dont la protéolyse peut mener à d'importants changements structuraux (Liu et al, 2004).

**Le protéasome** est un complexe enzymatique multicatalytique qui dégrade les protéines associées à l'ubiquitine (Ub). La conjugaison à une multichaîne d'ubiquitine (au moins quatre molécules d'Ub) signale la dégradation des protéines cibles par le protéasome 26S qui est composé d'une sous-unité catalytique 20S contenant les sites actifs des protéases et d'une sous-unité régulatrice 19S à chaque extrémité de la sous-unité catalytique. Les protéines multi-ubiquitinylées sont reconnues par une chaîne d'Ub liée à la sous-unité régulatrice 19S (Lam et al, 2002). La protéine cible attachée est dépliée (Navon et Goldberg, 2001) et entre dans la sous-unité 20S où la protéolyse commence. A travers la dégradation sélective de certaines protéines, l'ubiquitine médiant la protéolyse semble jouer un rôle central dans le contrôle de la fonction neuronale et dans l'homéostasie cellulaire. L'ubiquitinylation de certaines protéines impliquées dans l'apoptose telles que p53 et c-Jun permet leur dégradation (Hedge et DiAntonio, 2002 ; Ehlers, 2003).

## ***2-4 Autres mécanismes régulant l'apoptose***

### **A Le stress du réticulum endoplasmique**

La mitochondrie n'est pas le seul organite intracellulaire impliqué dans l'apoptose. En effet, différentes fonctions importantes pour la cellule comme les modifications post-traductionnelles, l'assemblage et l'acquisition de la conformation des protéines nouvellement synthétisées, se font dans le RE. Celui-ci sert également de réserve de calcium cellulaire. Ces fonctions sont vitales pour la survie de la cellule et la moindre modification altérant une de ces fonctions entraîne des dommages cellulaires irréversibles et conduit à l'apoptose. Plusieurs conditions peuvent conduire à un « stress du RE » telles que l'inhibition de la glycosylation des protéines, la diminution de la formation des ponts disulfures, la chute du calcium contenu dans la lumière du RE, les altérations du transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi ou l'expression de protéines anormalement conformées (Rao et al, 2004). Une voie de signalisation contrôle l'accumulation de ces dernières au niveau du RE (Oyadomari et al, 2002).

Plusieurs voies apoptotiques peuvent être induites après un stress du RE. L'une des voies les mieux caractérisées est l'induction transcriptionnelle de CHOP (pour «**C/EBP homologous protein**», nommée également GADD153) (Ron et Habener, 1992). CHOP est peu ou pas exprimée dans des conditions physiologiques normales et est fortement induite lors d'un stress du réticulum. Sa surexpression conduit à un arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose (Gotoh et al, 2002). Il a aussi été décrit que CHOP diminue l'expression de la protéine Bcl-2 et augmente la production de radicaux libres (McCullough et al, 2001).

Il existe également un autre mécanisme d'induction de l'apoptose par le RE qui s'effectue par l'activation de la kinase c-jun (JNK). Cette enzyme est impliquée dans des réponses cellulaires opposées comme la différenciation et la prolifération, ou l'apoptose. JNK a un rôle de régulateur transcriptionnel *via* les facteurs de transcription c-jun/AP-1. Elle permet l'induction de l'expression des ligands Fas/CD95-L, TNF $\alpha$  ou de la protéine p53. JNK peut aussi par phosphorylation inactiver Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>. Tous ces mécanismes peuvent fonctionner séparément ou coopérer pour induire l'apoptose (Herr et Debatin, 2001).

Un autre mécanisme met en jeu la caspase-12 localisée au niveau de la membrane du RE du côté cytosolique (Nakagawa et al, 2000). Cette caspase n'est pas impliquée dans les voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque (Oyadomari et al, 2002). Cette caspase est activée par la calpaïne, par IRE1 $\alpha$  (type I transmembrane endonuclease localized in the RE) / TRAF-2 et par la caspase-7 (Rao et al, 2004). La calpaïne activée est responsable du clivage de la pro-caspase-12 et de Bcl-X<sub>L</sub>, activant ainsi la caspase-12 et inhibant Bcl-X<sub>L</sub>. Une augmentation de calcium cytosolique peut activer la caspase-12. En 2003, Zong et collaborateurs démontrent d'une part que Bax et Bak sont bien localisés au niveau de la membrane du RE et d'autre part que dans des cellules déficientes en Bax et Bak, la pro-caspase-12 ne peut être clivée et par conséquent activée. Bax et Bak sont responsables de l'activation de la caspase-12 *via* une baisse progressive de calcium intra-RE. Bien que le rôle de la caspase-12 dans l'induction de l'apoptose ne soit pas encore bien établi, ces auteurs concluent que Bax et Bak initient l'activation de cette caspase. Nous ne savons pas aujourd'hui pourquoi la caspase-12 est activée uniquement après des stimuli apoptotiques sur le RE ; sa localisation intra-RE est peut-être l'explication. Cette caspase semble être essentielle pour l'apoptose RE-dépendante ce qui en fait une cible pharmacologique potentielle.

## B Le suppresseur de tumeur p53

La protéine p53 est souvent décrite comme le « gardien » du génome. Elle intervient pour maintenir l'intégrité du génome lors de nombreuses perturbations cellulaires : lésions génotoxiques, hypoxie, activation d'oncogènes cellulaires ou viraux, etc.... L'activation de p53 conduit soit à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire dont elle régule la phase G1/S, soit à l'apoptose (Levine, 1997).

Cette protéine régule une grande variété de gènes impliqués dans diverses fonctions. Elle peut conduire à un arrêt du cycle cellulaire en activant la CKI p21, la cycline D, GADD45, le cofacteur 14-3-3. Elle peut également réguler le gène GADD145 impliqué dans la réparation de l'ADN ou des gènes comme Bax, Bcl-X<sub>L</sub>, TGF $\alpha$ , Fas, FasL, DR5 impliqués dans l'apoptose. Mihara et collaborateurs (2003) ont montré que p53 pouvait induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe en formant un complexe avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>. L'interaction de p53 à Bcl-X<sub>L</sub> se fait par le domaine de liaison à l'ADN. D'autres gènes dépendants de p53 ont été décrits comme les gènes codants pour Apaf-1, NOXA (Oda et al, 2000) et PUMA (**p**53-**u**pre**g**ulated **m**odulator of **a**poptosis) (Nakano et Vousden, 2001). NOXA et PUMA sont tous les deux membres de la famille Bcl-2 possédant un domaine BH3. Le niveau des lésions sur l'ADN est également un facteur contribuant au choix entre survie ou mort cellulaire. La protéine p53 peut réguler cette grande variété de gènes en s'associant de façon sélective à différents facteurs de transcription (Farmer et al, 1996).

## C Rôle des protéines Hsp

Les protéines de stress thermique ou Hsp (**h**eat **s**hock **p**rotein) sont codées par des gènes dont l'expression est induite lors de divers stress cellulaires (inhibiteurs du métabolisme énergétique, un stress oxydatif, inflammation...). Lors de tels stimuli, ces protéines protègent les cellules en agissant sur les protéines altérées afin d'éviter leur agrégation (Skowrya et al, 1990). En conditions normales, les protéines Hsp, aussi appelées protéines chaperonnes, sont chargées du bon repliement des protéines, de leur translocation et de l'activation de protéines régulatrices comme les facteurs de transcription. Elles sont également capables de se lier à des protéines dénaturées afin de rétablir leurs fonctions (Jolly et Morimoto, 2000). Ces protéines



conservées au cours de l'évolution ont été classées en fonction de leur poids moléculaire. Les Hsp les mieux connues sont les Hsp 90, 70, 60 et 27.

Hsp70 et d'autres protéines chaperonnes ont également un rôle déterminant au cours de l'apoptose et au cours de la transformation cellulaire. En effet, l'AIF est inhibé par une protéine endogène, Hsp70 empêchant ainsi le recrutement puis l'activation de la procaspase-9 et par conséquent l'assemblage d'un apoptosome fonctionnel. Une surexpression de Hsp70 dans des cellules n'exprimant pas de caspases prévient également de la mort cellulaire ; ceci suggère donc que Hsp70 peut se lier à d'autres protéines que l'AIF (Ravagnan et al, 2001).

Il a également été démontré que la molécule Hsp27 pouvait intervenir dans l'apoptose. En effet, Pandey et collaborateurs en 2000 ont montré que Hsp27 ne peut pas empêcher la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9 mais qu'elle est capable d'inhiber l'activation de la caspase-3 en s'associant directement avec elle.

Récemment, il a été décrit qu'Hsp60 localisée sous forme de complexe dans la mitochondrie pouvait être libérée dans le cytosol et pouvait favoriser l'activation de la caspase-3 de manière ATP-dépendante après un stimulus pro-apoptotique (Xanthoudakis et al, 1999).

### **III- Apoptose et pathologies**

De très nombreuses maladies sont liées à des dérèglements des mécanismes qui contrôlent l'apoptose. Toute anomalie de l'apoptose peut être responsable du déclenchement et de la progression de pathologies caractérisées par un défaut d'apoptose ou par un excès d'apoptose. Ainsi, l'apparition de cellules tumorales ou la persistance de clones lymphocytaires auto-réactifs (maladies auto-immunes) peuvent être la conséquence d'un défaut dans le processus de mort. A l'opposé, l'apoptose pourrait être impliquée dans la mort neuronale observée au cours de certaines maladies neurodégénératives telles que l'amyotrophie spinale, la chorée de Huntington ou la maladie d'Alzheimer (MA). Le même phénomène est à l'origine de certaines pathologies provoquées par des infections virales comme le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) dans lequel le VIH (virus de

l'immunodéficience humaine) induit l'apoptose des cellules lymphocytaires T auxiliaires nécessaires à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Saikumar et al, 1999).

Dans ce paragraphe nous nous intéresserons essentiellement aux pathologies neurodégénératives.

La **maladie d'Alzheimer (MA)** est une maladie neurodégénérative conduisant progressivement et irréversiblement à la perte de la mémoire et des fonctions cognitives. Elle est caractérisée par la présence de plaques séniles (plaques  $\beta$ -amyloïde) et de dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et elle est associée à une importante perte neuronale (Morrison et Hof, 1997) qui n'est pas retrouvée chez les sujets âgés non déments (Gomez-Isla et al, 1997). Les premières études *post-mortem* réalisées dans les années 1990 ont montré la présence d'un grand nombre de neurones présentant une fragmentation de l'ADN dans les cerveaux Alzheimeriens (Su et al, 1994 ; Sugaya et al, 1997).

Il existe cependant d'autres arguments en faveur de l'implication des voies de l'apoptose dans le processus de dégénérescence neuronale dans la MA. En effet, la voie des récepteurs de mort semble impliquée dans la MA. Dans cette voie, l'apoptose est déclenchée par l'activation des récepteurs membranaires de mort cellulaire de la superfamille des TNF. Parmi les ligands de ces récepteurs on trouve le  $\text{TNF}\alpha$ , FasL et TRAIL.

Su et collaborateurs (2003) ont montré une augmentation de l'immunoréactivité du récepteur Fas et du ligand FasL dans des cerveaux Alzheimeriens ainsi qu'une colocalisation de FasL avec les plaques séniles et les neurites dystrophiques en association avec la caspase-8 activée. Feuk et collaborateurs (2000) ont observé dans des cas sporadiques à début précoce de la MA un polymorphisme du gène TNFRSF6 (localisé sur le bras long du chromosome 10) qui code pour Fas. De plus, au cours de l'apoptose neuronale induite par le peptide  $\beta$ -amyloïde, une augmentation du niveau de Fas et FasL ainsi qu'une activation de la voie JNK sont observées (Morishima et al, 2001). Par ailleurs une augmentation du niveau de  $\text{TNF}\alpha$  dans le tissu cérébral et dans le liquide céphalorachidien a été rapportée dans la MA (Tarkowski et al, 1999 ; Blasko et al, 2001). Le peptide  $\text{A}\beta$  des plaques amyloïdes, en activant la production du  $\text{TNF}\alpha$ , pourrait entraîner l'apoptose neuronale *via* la voie JNK (Combs et al, 1999). Cette production de  $\text{TNF}\alpha$  augmenterait à son tour la génération de peptide  $\text{A}\beta$  (Blasko et al, 2001). Le  $\text{TNF}\alpha$  pourrait avoir une action potentialisatrice de la neurotoxicité du peptide  $\text{A}\beta$  et augmenterait ainsi son action apoptotique. La voie TRAIL serait également impliquée

dans la dégénérescence neuronale observée dans la MA. En effet, une immunoréactivité de TRAIL a été observée dans le cortex cérébral à proximité des plaques amyloïdes colorées par le rouge Congo dans les cerveaux alzheimeriens (Uberti et al, 2004).

La voie mitochondriale semble aussi être impliquée dans la MA. En effet, un dysfonctionnement de la mitochondrie peut déclencher la voie intrinsèque de l'apoptose dans cette maladie (Mattson et Kroemer, 2003). Cette voie est régulée par des homologues de Bcl-2 qui sont des homologues soit pro-apoptotiques (Bad, Bax, Bim, Bid...) soit anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL...) (Sorenson, 2004). L'analyse *post-mortem* de cortex temporal de patients alzheimeriens a montré une augmentation de l'expression des homologues de Bcl-2 pro-apoptotiques (Bax, Bad et Bak) mais aussi anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-W et Bcl-X<sub>L</sub>) (Shimohama, 2000 ; Zhu et al, 2004). Il a été suggéré que l'augmentation du niveau des homologues anti-apoptotiques constituait un mécanisme compensatoire de neuroprotection. En outre, PAR-4 (prostate apoptosis response-4) est une protéine pro-apoptotique dont l'expression a été associée à une dégénérescence dans la MA et qui peut être induite par le peptide A $\beta$  (Guo et al, 1998 ; Guo et Xie, 2004). Elle semblerait favoriser la translocation de Bad et Bax vers la mitochondrie ce qui activerait la voie mitochondriale de l'apoptose (Mattson, 2000). Il a également été montré que dans les neurones affectés dans les cerveaux alzheimeriens il y avait une augmentation de l'expression de la protéine ABAD (A $\beta$ -binding-alcool-dehydrogenase). Cette enzyme est essentielle au fonctionnement de la mitochondrie et interagit avec le peptide A $\beta$  (Yan et al, 1997). Cette interaction A $\beta$ -ABAD est directement liée au dysfonctionnement de la mitochondrie et à la mort neuronale induite par A $\beta$  (Lutbader et al, 2004).

Il existe également des arguments qui plaident en faveur de l'implication du stress du RE dans la mort neuronale au cours de la MA. En effet, le RE est le lieu de synthèse et d'acquisition de la structure tridimensionnelle de la majorité des protéines. Or, la MA est caractérisée par l'accumulation de protéines mal repliées (A $\beta$  et tau) (Selkoe, 2004). Il a été observé *post-mortem* dans les cerveaux de cas familiaux de la MA une diminution du mécanisme de défense de la cellule, notamment de la réponse cellulaire à l'accumulation des protéines mal repliées (Imaizumi et al, 2001). De plus dans les cerveaux alzheimeriens, la présence d'une inhibition de la synthèse protéique, résultant de l'inactivation du facteur d'initiation de l'élongation par phosphorylation de sa sous-unité  $\alpha$  (EIF-2 $\alpha$ ), associée à une dégénérescence neuronale a été montrée (Chang et al, 2002).

De nombreuses données indiquent que les caspases sont activées au cours de la MA. En effet, plusieurs études ont montré dans les cerveaux alzheimeriens une présence plus importante de neurones immunopositifs pour des formes clivées (actives) des caspases. Gastard et collaborateurs (2003) ont mis en évidence que la caspase-3 était activée dans le cortex limbique dans des cas précoces de MA et qu'un fragment de la caspase-3 était colocalisé avec les PHF. Une autre étude a montré que la caspase-6 était activée dans le cortex frontal et temporal alors que le cervelet ne présentait pas cette activation (Guo et al, 2004). Le fragment actif de la caspase-8 et celui de la caspase-9 sont présents dans les neurones hippocampiques et dans les neurites dystrophiques autour des plaques amyloïdes (Rohn et al, 2001 ; Rohn et al, 2002). De plus, de nombreuses caspases clivent la protéine tau, générant une forme tronquée de tau (Cotman et al, 2005 ; Guillozet-Bongaarts et al, 2005). Ce clivage a été observé dans les cerveaux alzheimeriens (Rissman et al, 2004).

Toutes ces données indiquent que les différentes voies de l'apoptose pourraient être impliquées dans les processus dégénératifs de la MA. Cependant les liens entre l'activation des mécanismes de l'apoptose et l'apparition des lésions neuropathologiques restent à déterminer.

Des arguments permettent de suggérer l'implication d'un processus apoptotique dans la perte neuronale observée dans d'autres maladies neurodégénératives. En effet, la **sclérose latérale amyotrophique (SLA)** se caractérise par la perte progressive des motoneurones entraînant l'atrophie des muscles squelettiques et leur paralysie. L'étude *post-mortem* de la moelle épinière de patients de SLA permet d'observer une fragmentation de l'ADN motoneuronal qui n'est pas retrouvée chez les sujets témoins (Troost et al, 1995). Chez les souris transgéniques exprimant le gène responsable des formes familiales de SLA (gène de la SOD cuivre/zinc), la surexpression du gène anti-apoptotique *bcl-2* atténue la perte des motoneurones (Kostic et al, 1997).

La **chorée de Huntington** est une maladie héréditaire associée à un excès d'apoptose. Cette affection est attribuée à la mort apoptotique des neurones du striatum puis du cortex cérébral. La gravité de la maladie est fonction du nombre de triplet : motif répété (CAG)<sub>n</sub> situé dans la partie codante du gène de la huntingtine et traduit en une répétition polyglutamine. Aux environs de 40 répétitions le seuil pathologique est atteint. Cette protéine polyglutamine anormale a une affinité réduite pour la protéine Hip-1 qui s'associe alors avec

une autre protéine nommée Hippi. Ce complexe Hip-1/Hippi se forme dans le cytosol et recrute la pro-caspase-8 déclenchant ainsi son activation et celle de la cascade des caspases (Gervais et al, 2002).

La **maladie de Parkinson** se caractérise par la perte progressive des neurones dopaminergiques du système giro-striatal entraînant les signes cliniques de la maladie : akinésie, rigidité, tremblement. L'étude en microscopie électronique des cerveaux de patients parkinsoniens révèle que ces neurones dopaminergiques meurent par apoptose (Ruberg et al, 1997). De plus, l'expression du gène *p53*, impliquée dans l'apoptose, est augmentée dans les cerveaux parkinsoniens (De la Monte et al, 1998). Il a également été montré que l'expression dans le système nerveux central du TNF $\alpha$  et de ses récepteurs constitue un élément clé dans la réponse inflammatoire et dans l'apoptose observée dans cette maladie (Nagatsu et al, 2000).

Enfin, l'expression du gène *p53* ainsi que celle du gène codant pour le récepteur CD95 sont augmentées dans les cerveaux de patients atteints d'autres maladies neurodégénératives comme la **démence à corps de Lewy diffus** ou la **maladie de Pick**, suggérant l'existence d'un processus apoptotique dans ces affections (De la Monte et al, 1997).

## **PARTIE 2 : LA PROTEINE TAU**

### **I- Structure de la protéine tau**

#### ***1- Le gène de la protéine tau humaine et son expression***

Le gène codant la protéine tau est situé sur le chromosome 17 au locus 17q21 (Neve et al, 1986). Ce gène comporte 16 exons s'étendant sur 100 kpb (Andreadis et al, 1992). Le transcrit primaire subit un épissage alternatif complexe, régulé au cours du développement et en fonction du type neuronal (Figure 12). En effet, dans le cerveau humain, les exons 4A, 6 et 8 ne sont pas traduits. Ces exons sont spécifiquement exprimés dans certains types de neurone du système nerveux périphérique (Couchie et al, 1992 ; Georgieff et al, 1993). A titre d'exemple, l'exon 4A est retrouvé dans les tissus périphériques du bovin, de l'homme et du rat avec un fort degré d'homologie. Aucun ARN messenger (ARNm) de tau avec soit l'exon 6 soit l'exon 8 n'a encore été décrit chez l'homme. Quelques transcrits avec l'exon 8 ont été retrouvés dans les cerveaux de bovin et de singe rhésus (Himmler et al, 1989 ; Nelson et al, 1996).

Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont exprimés de façon constitutive. Les exons 2, 3 et 10 sont également sujets à un épissage alternatif et sont exprimés spécifiquement chez l'adulte dans la plupart des régions du système nerveux central (Goedert et al, 1989b).

Dans le système nerveux humain, trois transcrits des protéines tau de 2, 6 et 8 kb ont été identifiés. L'ARNm de 2 kb semble coder pour l'isoforme de tau retrouvée dans le noyau tandis que les transcrits de 6 et 8 kb codent pour les isoformes cytoplasmiques et sont respectivement spécifiques des systèmes nerveux central et périphérique (Goedert et al, 1988 ; Couchie et al, 1992 ; Wang et al, 1993).

Les transcrits de 6 kb, trouvés en grande quantité dans le système nerveux central (Kosik et al, 1989), sont constitués de 6 isoformes qui diffèrent entre elles par les exons 2, 3 et 10. Les différentes combinaisons possibles des ARNm sont : 2-3-10- ; 2-3-10+ ; 2+3-10- ; 2+3-10+ ; 2+3+10- ; et 2+3+10+ (Goedert et al, 1989a ; Goedert et al, 1989b ; Kosik et al, 1989). Seul le plus petit transcrit (352 aa), ne contenant aucun des inserts codés respectivement par les exons 2, 3 et 10 et correspondant à la combinaison 2-3-10-, est retrouvé au stade foetal alors que les 6 transcrits sont exprimés chez l'adulte. Les transcrits codant pour les différentes isoformes de tau sont non seulement exprimés différemment en fonction du stade de développement mais également en fonction du type cellulaire. En effet, dans le cerveau adulte, les transcrits avec ou sans l'exon 10 sont trouvés dans les corps cellulaires des cellules pyramidales de toutes les couches du cortex. En revanche, dans la formation hippocampique, seuls les transcrits sans l'exon 10 sont détectés dans les cellules granulaires et pyramidales (Goedert et al, 1989a).

Bien que plus minoritaires que les transcrits de 6 kb, les transcrits de 2 kb ont été mis en évidence dans deux lignées de neuroblastomes humains ainsi que dans le cerveau (Goedert et al, 1988 ; Wang et al, 1993). Ce transcrit code pour l'isoforme nucléaire de la protéine tau. Cette protéine tau nucléaire est localisée au niveau du nucléole et pourrait être impliquée dans la transcription des ARN ribosomiaux.

Les transcrits de 8 kb sont préférentiellement retrouvés dans le système nerveux périphérique (Nunez et Fischer, 1997). Ils ont été également mis en évidence dans la moelle épinière et la rétine (Boyne et al, 1995). Ces transcrits de 8 kb sont à l'origine des protéines tau de haut poids moléculaire. Ils contiennent l'exon 4A (présent entre les exons 4 et 5) et plus rarement l'exon 6 (présent entre les exons 5 et 7). Comme les autres transcrits tau, ces transcrits de 8 kb semblent être soumis à un épissage alternatif conduisant à plusieurs isoformes de protéine tau de haut poids moléculaire (Couchie et al, 1992).

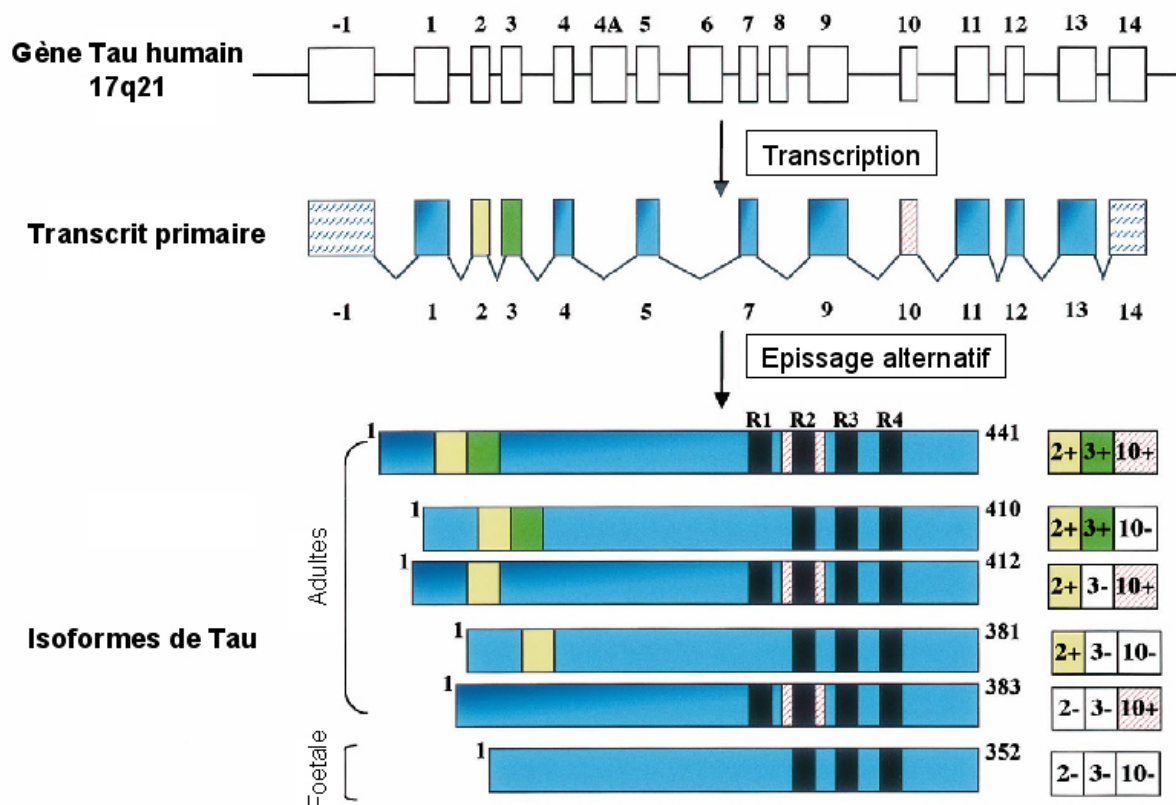


Figure 12 : Représentation schématique du gène de la protéine tau humaine, de son transcrit primaire et de ses 6 isoformes (d'après Buée et al, 2000).

## 2- Les différentes isoformes de la protéine tau humaine

Les 6 isoformes de tau diffèrent par leur taille qui varie de 352 à 441 acides aminés (aa) avec un poids moléculaire apparent de 45 à 65 kDa (Goedert et al, 1989 a,b). Ils diffèrent également par la présence ou non d'un ou deux inserts de 29 ou 58 aa du côté *N*-terminal (séquence correspondant aux exons 2 et 3) et de trois ou quatre inserts codant pour une séquence répétitive de 31 aa (noté R) dans la partie *C*-terminale (exon 10) (Goedert et al, 1989a ; Kosik et al, 1989 ; Goedert et Jakes, 1990). Les motifs R constituent le point d'ancrage de la protéine tau sur les microtubules. Ainsi 3 isoformes auront 3 séquences de liaison aux microtubules (3R) et les 3 autres en présenteront 4 (4R). Elles n'interagiront alors pas de la même manière avec la tubuline ; les 4R se fixant plus fortement aux microtubules que les 3R (Figure 12). Ces séquences répétitives contiennent toutes un motif Pro-Gly-Gly-Gly et sont riches en résidus basiques : elles constituent le domaine de fixation de la protéine tau aux microtubules (Lee et al, 1989 ; Himmler et al, 1989). Elles sont codées par les exons 9 à 12 (Wei et Andreadis, 1998).



L'hétérogénéité de la protéine tau chez l'homme provient non seulement de l'épissage alternatif des transcrits mais également des modifications post-traductionnelles que subit la protéine tau au cours du développement (cf paragraphe II) (Buée et al, 2000).

### ***3- Les différentes isoformes de la protéine chez les autres mammifères***

La protéine tau a été étudiée chez d'autres espèces de mammifères telles que le rat (Kosik et Finch, 1987), la souris (Lee et al, 1988), le bovin (Himmler, 1989 ; Himmler et al, 1989), la chèvre (Nelson et al, 1996) et le singe rhésus (Nelson et al, 1996). Nous nous intéresserons particulièrement à la protéine tau de rat en raison du modèle expérimental que nous avons utilisé dans ce travail (cultures primaires de neurones corticaux de rat).

La séquence en aa de la protéine tau de rat présente un haut degré d'homologie avec la séquence humaine : la moitié C-terminale est hautement conservée à travers les espèces, en particulier les séquences répétitives R comportant le térapeptide Pro-Gly-Gly-Gly, alors que la partie N-terminale est plus variable (Kosik et al, 1989).

La séquence de l'ADNc de la protéine tau de rat présente deux inserts non exprimés durant la période fœtale (Figure 13) :

- un insert codant pour 31 aa situé dans la région C-terminale.
- un insert codant pour 58 aa situé dans la région N-terminale.

L'expression de ces deux inserts débute en période post-natale et perdure chez l'adulte (Kosik et al, 1989). *In vitro*, le passage des ARNm de type fœtal aux ARNm de type adulte se produit entre le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour de culture ; au-delà, seuls les ARNm de type mature sont exprimés (Przyborski et Cambray-Deakin, 1995). Les ARNm (de type fœtal et mature) ont une taille de 6 kb comme ceux de la protéine tau humaine (Kosik et al, 1989; Przyborski et Cambray-Deakin, 1995).

Collet et collaborateurs, en 1997, ont démontré qu'au cours de la période post-natale, des ARNm contenant seulement la moitié de l'insert N-terminal sont exprimés dans certains

neurones. Cet insert correspondrait en fait à deux exons (codant chacun pour une séquence de 29 aa) qui seraient les homologues des exons 2 et 3 chez l'homme.

Il existe donc 3 isoformes de la protéine tau chez le rat (Figure 13) :

- une isoforme fœtale ne contenant que 3 séquences répétitives R en C-terminale et pas d'insert N-terminal (comme chez l'homme)
- deux isoformes adultes contenant 4 séquences répétitives R et 1 ou 2 séquences N-terminale de 29 aa (Collet et al, 1997).

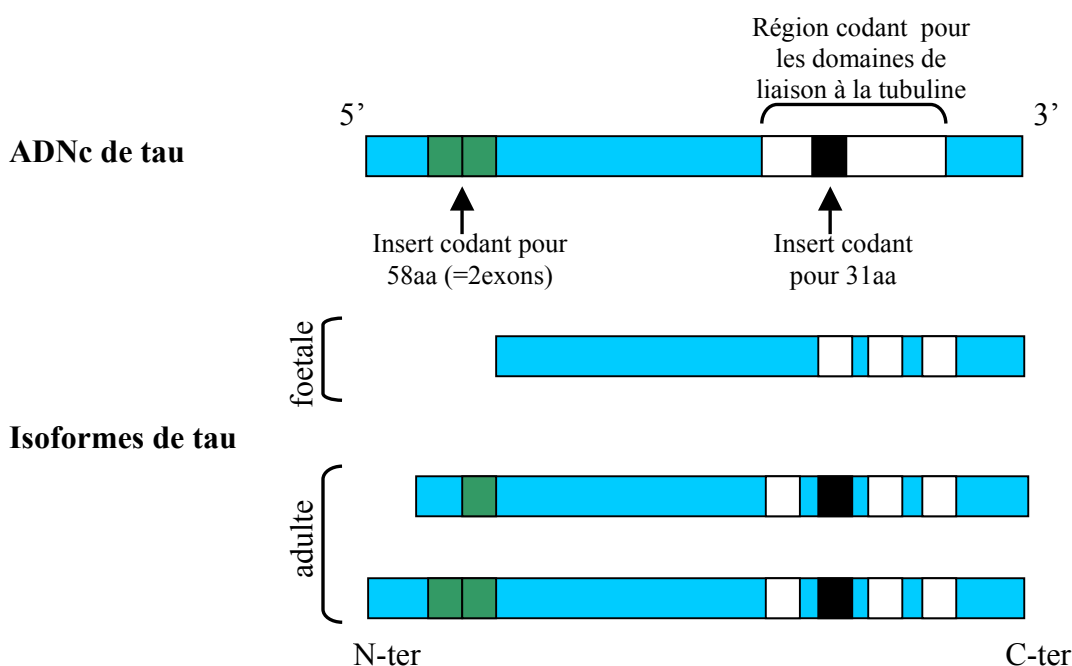


Figure 13 : Représentation schématique de l'ADNc et des 3 isoformes de la protéine tau de rat (d'après Kosik et al, 1989a et Collet et al, 1997).

## II- Les modifications post-traductionnelles de la protéine tau

La protéine tau peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou la O-glycosylation. Cette dernière pourrait avoir des fonctions modulatrices similaires à la phosphorylation. La protéine tau peut encore subir des modifications par nitration ou par sulfatation (pour revue Chen et al, 2004). La modification post-traductionnelle de la protéine tau la plus importante est la phosphorylation, c'est pourquoi nous allons l'étudier plus en détail.

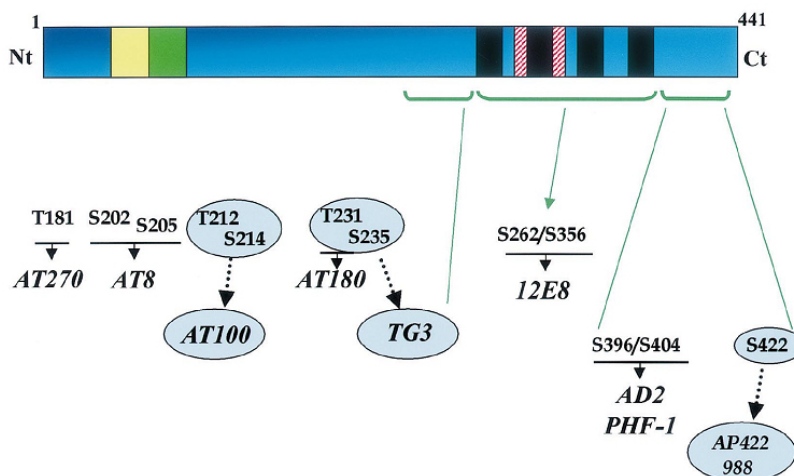
## 1- Phosphorylation

Dans des conditions physiologiques, la protéine tau est phosphorylée. On dénombre approximativement 80 sites putatifs de phosphorylation. La plupart de ces sites sont des sérines et des thréonines suivies de prolines (sites SP/TP). L'isoforme fœtale est phosphorylée sur des sites plus nombreux que les isoformes adultes. Ces particularités réduisent l'affinité de l'isoforme tau fœtale pour les microtubules et lui confèrent un rôle important dans la plasticité neuronale au cours du développement. En effet, cette affinité réduite facilite le passage des microtubules de l'état polymérisé à l'état dépolymérisé. Le niveau de phosphorylation de la protéine tau diminue à partir de la période néo-natale et permet la stabilisation du cytosquelette neuronal (Matsuo et al, 1994). Ceci indique qu'une déphosphorylation de tau est nécessaire durant le développement du cerveau.

La régulation de l'état de phosphorylation de la protéine tau résulte des activités conjointes de protéines kinases et de protéines phosphatases (Billingsley et Kincaid, 1997). Parmi les protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau, on retrouve les PDPK (**proline directed protein kinases**). Elles phosphorylent les résidus Ser et Thr suivis d'une proline. Les Cdk (**kinases dépendantes des cyclines**), la GSK-3 $\beta$  (**glycogen synthétase kinase-3 $\beta$** ) et la famille des MAP-kinases (**mitogen activated protein kinase**) (ERK et SAPK) font partie des PDPK. D'autres kinases, les non-PDPK, peuvent phosphoryler tau sur des sites non ST/TP, parmi lesquelles, la CaMPK II, et la cAMP-dependent protein kinase (PKA). La déphosphorylation de Tau résulte essentiellement de l'activation des Ser/Thr protéines phosphatases, comme la PP1, la PP2A et la PP2B ou calcineurine.

La protéine tau est phosphorylée sur des sites « physiologiques » de phosphorylation reconnus par des anticorps anti-tau dépendant de la phosphorylation (AD-2, AT-8, AT-180, AT-270 et 12E8). Cette phosphorylation règle la liaison de tau aux microtubules. Les sites « pathologiques » sont ceux de la phosphorylation anormale des protéines tau qui caractérise certaines pathologies neurodégénératives appelées tauopathies (cf paragraphe V-2). Ils comprennent le site R145d/AP422 ou Ser-422, le site AT-100 ou Ser212/THR214, et le site PHF-27/TG3 ou Thr-231/Ser-356 dont la reconnaissance par l'anticorps TG3 dépend de la phosphorylation et de la conformation (Jicha et al, 1997 ; Bussière et al, 1999). La

numérotation des acides aminés reconnus est celle de l'isoforme la plus longue (Figure 14) (Buée et Delacourte, 2002).



**Figure 14 : Phosphorylation de la protéine tau et anticorps phospho-dépendants correspondants. Les sites « pathologiques » sont entourés d'un cercle (d'après Buée et al, 2000).**

Bien que de nombreuses protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau aient été étudiées, seules quelques unes ont été considérées comme de bonnes candidates en tant que kinases agissant sur la protéine tau.

- **LES KINASES**

- **Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  : GSK-3 $\beta$**

Une des premières kinases étudiées est la GSK-3 $\beta$  (pour revue Doble et Woodgett, 2003). La glycogen synthase kinase-3 a été purifiée pour la première fois en 1981, dans les muscles squelettiques, par Hemmings et collaborateurs. Deux formes ont été identifiées : la GSK-3 $\alpha$  et la GSK-3 $\beta$ . La protéine GSK-3 $\beta$  a un poids moléculaire de 47 kDa. Elle est fortement exprimée dans le cerveau, où elle est localisée dans les neurones, et ainsi est présente dans le compartiment où se trouve la protéine tau. Cette protéine kinase sérine/thréonine multifonctionnelle est exprimée de façon constitutive dans les neurones (Hanger et al, 1992). Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire (Frame et Cohen, 2001) et a été identifiée comme un important régulateur du destin cellulaire du neurone (Facci et al, 2003). Cette enzyme est active de façon constitutive et peut être inhibée par différentes voies de signalisation (la voie Wnt et la voie d'inhibition de l'apoptose passant par Akt) ainsi que par la phosphorylation par

la protéine kinase C (Dale, 1998 ; Pap et Cooper, 1998). Des expériences, *in vivo*, ont permis de mettre en évidence l'importance de GSK-3 $\beta$  dans la phosphorylation de tau. En effet, des souris transgéniques sur-exprimant GSK-3 $\beta$  présentent une augmentation de la phosphorylation de la protéine tau au niveau de plusieurs épitopes (Spittaels et al, 2000). D'autre part, l'inhibition de GSK-3 $\beta$  par le lithium dans des neurones diminue la phosphorylation de tau (Lovestone et al, 1999). Cependant, GSK-3 $\beta$  phosphoryle et régule de nombreuses autres protéines (Jope et Johnson, 2004).

#### **- Cyclin-dependent kinase 5 : Cdk5**

Une autre kinase pouvant phosphoryler la protéine tau est la Cdk5. C'est une PDPK associée aux microtubules. Elle joue un rôle dans la différenciation des neurones (Shelton et Johnson, 2004). *In vivo*, tau est un substrat de Cdk5 et la plupart des sites phosphorylés par Cdk5 sont aussi phosphorylés par GSK-3 $\beta$  (Liu et al, 2002). La surexpression de Cdk5 augmente la phosphorylation de tau (Hamdane et al, 2003 ; Hallows et al, 2003). En outre, Cdk5 semble réguler indirectement des kinases et des phosphatases agissant sur tau. En effet, Morfini et collaborateurs ont montré dans des modèles de cellules neuronales que l'inhibition de Cdk5 mène à l'activation de GSK-3 $\beta$  (Morfini et al, 2004).

#### **- cAMP-dependent protein kinase : PKA**

Bien que la majorité des sites de la protéine tau soit phosphorylée sur des sérines et des thréonines suivies de prolines, des sites Ser et Thr non suivis par des résidus Pro sont aussi phosphorylés. La protéine tau peut être phosphorylée par la PKA et cette phosphorylation modifie les interactions entre la protéine tau et la tubuline (Scott et al, 1993) et diminue la sensibilité de la protéine tau à l'hydrolyse par la calpaïne (Litersky et Johnson, 1992). En outre, sur la protéine tau, de nombreux sites phosphorylés en réponse à l'augmentation du niveau de cAMP sont également phosphorylés par la PKA (Flemming et Johnson, 1995).

#### **- Microtubule-affinity-regulating kinase : MARK**

Les MARK peuvent aussi réguler la phosphorylation de tau *in vivo*. MARK phosphoryle les motifs KXGS, qui sont présents dans chaque motif R du domaine de liaison aux microtubules aussi bien que d'autres protéines associées aux microtubules (Drewes et al, 1997).

Globalement, il est clair que GSK-3 $\beta$ , Cdk5, PKA et MARK modulent la phosphorylation de tau *in vivo*, soit directement soit indirectement. De nombreuses autres kinases, quand elles sont surexprimées, peuvent augmenter la phosphorylation de tau dans des modèles non neuronaux. Cependant, sans la validation dans un vrai système neuronal dans lequel les protéines kinases sont exprimées dans un contexte approprié, le rôle de ces kinases dans la modulation de la phosphorylation *in vivo* reste à établir.

### • LES PHOSPHATASES

La régulation de l'état de phosphorylation de la protéine tau résulte également de l'activité des protéines phosphatases. En effet, la réversibilité de la phosphorylation des protéines est un mécanisme biochimique ubiquitaire, impliqué dans la régulation des mécanismes cellulaires. Ce mécanisme est appelé **déphosphorylation**.

Il a été montré que des phosphatases endogènes présentes dans le cerveau adulte et dans des cellules de neuroblastomes déphosphorylaient des protéines tau (Matsuo et al, 1994 ; Buée-Scherrer et al, 1996). A ce jour, seuls les résidus Ser et Thr sont retrouvés phosphorylés sur les protéines tau, suggérant la régulation de la phosphorylation de ces sites par des protéines phosphatases (PP) également dirigées contre des résidus Ser/Thr. Ces PP sont classées en 5 groupes selon leurs spécificités envers leurs substrats, leurs activateurs et inhibiteurs: PP1, PP2A, PP2B encore appelée calcineurine, PP2C et PP5 (Sergeant et al, 2005). Toutes ces protéines phosphatases sont présentes dans le cerveau mais peuvent être différemment exprimées au cours de la vie (Dudek and Johnson, 1995).

#### - Protéine phosphatase 1 : PP1

Les protéines phosphatases de type 1 ou PP1 sont constituées par l'association d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. La diversité des protéines phosphatases de type 1 résulte de l'existence de plusieurs isoformes de cette sous-unité régulatrice (pour revue: Mumby et Walter, 1993). L'action phosphatasique de PP1 peut être bloquée par certaines toxines, extraites d'éponges marines, à des concentrations précises, telles que l'acide okadaïque (100 nM) et la calyculine A (50 nM). La PP1 a été impliquée dans la déphosphorylation des protéines tau (Yamamoto et al, 1988 ; 1995).

### - Protéine phosphatase 2A : PP2A

Cette enzyme est composée de trois sous-unités ayant chacune un rôle bien déterminé:

- une sous-unité structurale (la sous-unité A),
- une sous-unité catalytique (la sous-unité C),
- une sous-unité régulatrice (la sous-unité B).

Plusieurs PP2A ont été décrites. Elles proviennent de l'association de différentes sous-unités régulatrices B à la forme hétérodimérique AC (pour revue: Janssens et Goris, 2001). Cette sous-unité B régule l'activité phosphatasique et la spécificité de la PP2A. Cette protéine phosphatase peut être inhibée par l'acide okadaïque (concentration inhibitrice: 1-10 nM), la calyculine A (concentration inhibitrice: 1-5 nM), ou la tautomycine (produite par *Streptomyces spiroverticillatus*).

*In vitro*, la PP2A est capable de déphosphoryler efficacement les protéines tau recombinantes préalablement phosphorylées par certaines kinases de type PDPK (Goedert et al, 1995). La déphosphorylation endogène des protéines tau dans des cellules de type neuronal, provoquée ou non par des agents dépolymérisants, comme la colchicine, pourrait être médiée par cette protéine phosphatase, la PP2A (Fleming et Johnson, 1995; Merrick et al, 1996). Elle déphosphorylerait spécifiquement les protéines tau au niveau des résidus Ser46, 199, 202, 396 et 404 (Ono et al, 1995) et Thr205 (Merrick et al, 1996). Cette phosphatase est retrouvée associée aux microtubules dans un grand nombre de lignées cellulaires, d'origine neuronale ou non. Cette localisation présente la PP2A comme bonne candidate pour la déphosphorylation des protéines tau *in vivo* (Sontag et al, 1995).

### - Protéine phosphatase 2B : PP2B

Cette protéine phosphatase, encore appelée calcineurine, est exprimée de manière prédominante dans le tissu nerveux. Comme pour la PP2A, il existe plusieurs isoformes de la sous-unité catalytique conduisant à plusieurs formes de la PP2B. Cette PP2B, dépendante du calcium et de la calmoduline, peut être inhibée par des agents chélateurs du calcium, comme l'EGTA, ainsi que par des toxines comme la cyclosporine A ou l'acide okadaïque (à concentration élevée 5  $\mu$ M) (Mumby et Walter, 1993). L'expression et l'association aux microtubules de cette PP2B augmentent au cours de la vie et demeurent élevées au stade adulte (Dudek et Johnson, 1995). La calcineurine jouerait un rôle important au niveau des fonctions des microtubules en déphosphorylant les protéines microtubulaires tau et MAP2

(Goto et al, 1985). En augmentant la concentration du calcium intracellulaire dans des cellules nerveuses, Fleming et Johnson, en 1995, ont observé la déphosphorylation des protéines tau. Cette déphosphorylation est inhibée par la cyclosporine A, impliquant spécifiquement l'activité phosphatase de la PP2B. Cette protéine phosphatase est impliquée dans la déphosphorylation des protéines tau au niveau des résidus Ser46, 199, 202, 235, 396 et 404 (Fleming et Johnson, 1995).

### **- Protéine phosphatase 5 : PP5**

La protéine phosphatase 5 est exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus de mammifères examinés et se trouve à un niveau très élevé dans le cerveau, mais encore peu de chose sont connues sur ses substrats physiologiques. Cette phosphatase déphosphoryle tau à la fois *in vitro* et dans les cellules en culture (comme PC12) suggérant que cette phosphatase pourrait jouer un rôle dans le contrôle du niveau de phosphorylation de tau (Gong et al, 2004).

## ***2- Glycosylation, glycation et autres modifications***

La glycosylation est l'une des modifications post-traductionnelles les plus courantes des protéines. Des oligosaccharides se lient à la chaîne polypeptidique de façon covalente. Il existe deux types de glycosylation : la N-glycosylation (les sucres sont liés au groupement NH<sub>2</sub> du résidu Asparagine) et la O-glycosylation (les sucres sont liés au groupement hydroxyle d'une sérine et/ou d'une thréonine). Les modifications de glycosylation semblent impliquées dans la régulation de la transcription, dans la dégradation des protéines, dans l'activation et la régulation du cycle cellulaire et, dans l'assemblage de complexes multiprotéiques (Lefebvre et al, 2003). De plus, cette glycosylation peut réguler l'état de phosphorylation de certaines protéines. La glycosylation de la protéine tau a été découverte par Wang et collaborateurs en 1996a. Sur les protéines tau, bien que le nombre de sites potentiellement O-glycosylables soit plus faible que le nombre de sites phosphorylables, la glycosylation peut agir directement sur la fonction des protéines tau. En fait, la O-glycosylation et la phosphorylation ont des effets diamétralement opposés (Liu et al, 2002). Ainsi, la glycosylation peut moduler l'interaction des protéines tau avec la tubuline en contrebalçant leur état de phosphorylation. Enfin, la O-glycosylation pourrait jouer un rôle sur la localisation cellulaire et la dégradation des protéines tau (Lefebvre et al, 2003).



Au contraire de la glycosylation, la glycation est une modification post-traductionnelle non enzymatique impliquant une liaison covalente entre un sucre et un groupe amino spécifique de la protéine formant la céto-amine. Suite à une oxydation, la fragmentation de la céto-amine mène à la production d'AGE (advanced glycation endproducts). La formation des AGE provoque des effets préjudiciables sur la structure et la fonction des protéines affectées (Munch et al, 2003).

Il existe également d'autres modifications post-traductionnelles comme la nitration des résidus tyrosine dans les protéines, telles que tau, médiée par la peroxy-nitrite. La peroxy-nitrite est le produit de la réaction entre un oxyde de nitrite et des radicaux superoxydes (Good et al, 1996). De plus, des immunomarquages ont permis de montrer la présence de résidus nitrés et de thio-S-flavine dans les protéines tau agrégées générées dans la lignée oligodendrocytaire après un traitement à la peroxy-nitrite. Ceci implique donc que la nitration et la sulfatation ont un lien direct avec la formation des inclusions filamenteuses de tau (Horiguchi et al, 2003). L'impact de ces modifications sur la fonction de tau est moins connu. Elles apparaissent sur la protéine tau pathologique.

### **III- La localisation de la protéine tau**

A l'origine, la protéine tau a été caractérisée dans le cerveau (Weingarten et al, 1975) et de très nombreuses études ont montré depuis qu'elle s'exprime majoritairement dans le tissu nerveux. Dans le cerveau, elle est particulièrement abondante dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet. Elle est également détectée dans la moelle épinière et le système nerveux périphérique (Trojanowski et al, 1989). Elle est aussi présente en beaucoup plus faible quantité dans d'autres organes tels que le cœur, le muscle, le rein et le foie (Gu et al, 1996) ou les fibroblastes (Ingelson et al, 1996).

Dans le cerveau, la protéine tau est essentiellement localisée dans les neurones et elle a longtemps été considérée comme une protéine spécifiquement neuronale (Binder et al, 1985 ; Drubin et al, 1986 ; Goedert et al, 1988 ; Kosik et al, 1989). Cependant, elle a aussi été détectée dans les astrocytes mais en quantité 100 fois moins importante que dans les neurones (Couchie et al, 1988) et dans les oligodendrocytes (Spillantini et al, 1997).

Dans les neurones, caractérisés par une structure polarisée avec un compartiment axonal et un compartiment somato-dendritique, la protéine tau est essentiellement axonale (Binder et al, 1985 ; Brion et al, 1988). Cette protéine est donc localisée majoritairement dans l'axone des neurones, plus rarement dans les dendrites et exceptionnellement dans les corps cellulaires. Au cours de certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, cette localisation préférentiellement axonale peut être modifiée (comme nous le verrons ultérieurement).

## IV- Fonctions de la protéine tau

### 1- La liaison de tau aux microtubules

Les microtubules sont de longs filaments creux composés de polymères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  très instables (Tao et al, 1988). Ils sont stabilisés par une famille de protéines : les MAP (**m**icrotubules **a**ssociated **p**roteins), ayant la propriété de s'associer aux microtubules dont elles favorisent l'assemblage et la stabilité. Parmi ces MAP il y a la **protéine tau** (Goedert et al, 1989a). La protéine tau est l'une des principales protéines associées aux microtubules dans les neurones et se lie aux molécules de tubuline permettant ainsi leur polymérisation (Weingarten et al, 1975) (Figure 15). Elle favorise la fixation du GTP sur la tubuline, étape importante de l'assemblage des microtubules (Khatoun et al, 1995). Elle induit la nucléation et la croissance des microtubules *in vitro* (Brandt et Lee, 1993a, b).

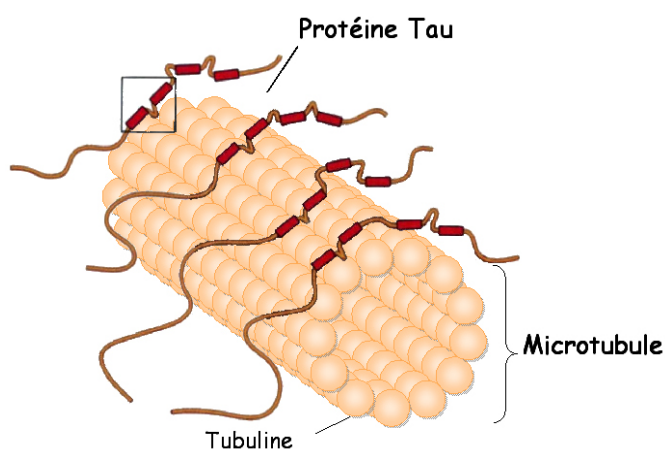


Figure 15 : Structure d'un microtubule (d'après Delacourte, 2003).

La protéine tau est divisée en deux domaines fonctionnels : le domaine de liaison aux microtubules et le domaine de projection. Ces différentes régions ont différentes propriétés chimiques et physiologiques (pour revue Buée et al, 2000 et Sergeant et al, 2005).

- **Le domaine de projection :**

Il se situe dans la région N-terminale (Figure 16). Il a une longueur variable qui résulte de l'insertion de 29 ou 58 acides aminés selon les isoformes. Ces acides aminés supplémentaires rendent cette extrémité amino-terminale hautement acide. Cette extrémité N-terminale n'est pas associée aux microtubules et constituerait un domaine de projection qui s'oriente vers l'extérieur du microtubule (Hirokawa et al, 1988) où il pourrait interagir avec des éléments du cytosquelette et avec la membrane plasmique. Ce domaine déterminerait l'espace entre les microtubules dans l'axone et pourrait augmenter le diamètre axonal (Chen et al, 1992). Ceci suggère que la région N-terminale de la protéine tau est cruciale dans la stabilisation et l'organisation de certains type d'axones.

La protéine tau se lie aux filaments d'actine et de spectrine (Henriquez et al, 1995). Grâce à ces interactions, la protéine tau permet aux microtubules de se lier avec d'autres éléments du cytosquelette tels que les neurofilaments (Miyata et al, 1986) ce qui diminue leur flexibilité (Matus, 1994). Elle pourrait interagir avec la membrane plasmique et certaines études ont permis de préciser le rôle probable de cette interaction de tau avec la membrane plasmique (Brandt et al, 1995). Ainsi, il semblerait que le domaine riche en proline de tau (ayant pour séquence  $_{231}\text{Thr-Pro-Pro-Lys-Ser-Pro-Ser}_{237}$ ) (Figure 16), puisse interagir avec les domaines SH3 des tyrosines kinases non récepteurs de la famille src, comme Fyn (Lee et al, 1998 ; Williamson et al, 2002). Ces travaux décrivent une interaction et une co-localisation entre tau et Fyn au niveau de la membrane plasmique qui s'associeraient avec les filaments d'actine. Ces données permettent de définir un rôle probable du domaine de projection de tau dans la voie de transduction des tyrosines kinases de la famille src. Il pourrait agir sur les filaments d'actine, donc sur la forme de la cellule nerveuse (Lee et al, 1998).

- **Le domaine de liaison aux microtubules :**

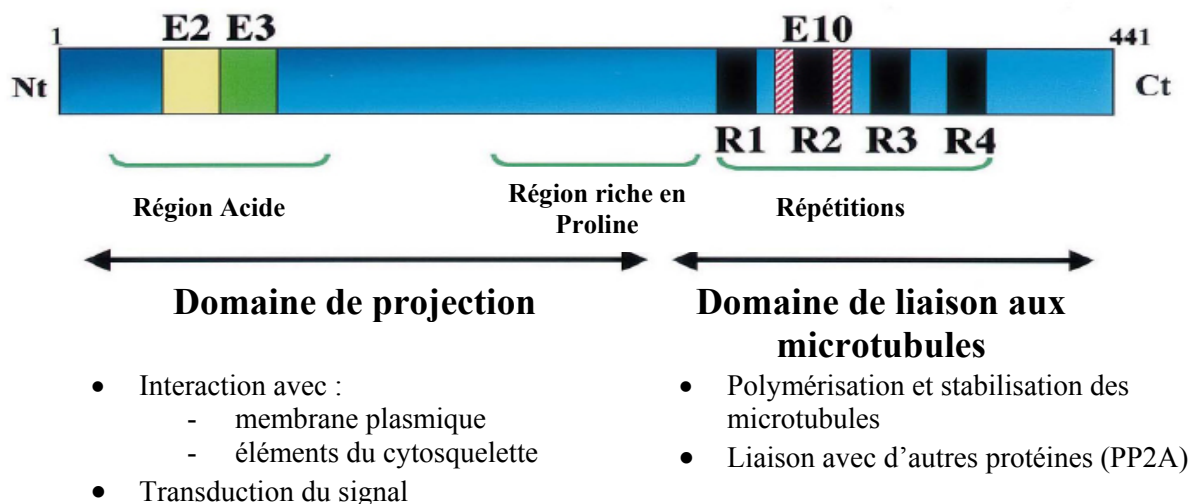
C'est une région C-terminale très basique (Figure 16). Elle est responsable de l'interaction des protéines tau avec les microtubules. Cette extrémité C-terminale contient trois (3R) ou quatre (4R) séquences de 18 acides aminés hautement conservés (Lee et al, 1988 ; Goedert et al, 1989a ; Himmler, 1989). La comparaison de ces séquences répétitives montre

que 11 acides aminés sont identiques dans ces quatre séquences. Chacune de ces séquences contient un motif particulier de quatre acides aminés: Pro-Gly-Gly-Gly. Ces séquences répétées, séparées les unes des autres par 13 à 14 acides aminés, beaucoup moins bien conservées, sont appelées zones de jonction (Figure 16). Les protéines tau permettent l'assemblage de la tubuline en microtubules en diminuant l'instabilité de la tubuline (Drechsel et al, 1993) et sont impliquées dans le transport axonal (Brandt et al, 1993a). Les isoformes avec 4R (R1-R4) chez l'adulte ont une plus grande affinité pour les microtubules que l'isoforme fœtale avec 3R (R1, R2 et R4) (Goedert et Jakes, 1990).

La région de liaison aux microtubules est également impliquée dans d'autres fonctions que l'assemblage aux microtubules. En effet, il existe une compétition directe de liaison entre le domaine de liaison aux microtubules et les microtubules d'une part, et d'autre part le domaine de liaison aux microtubules et la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Sontag et al, 1999). Donc, les microtubules peuvent inhiber l'activité de PP2A en se liant à la protéine tau par le domaine de liaison aux microtubules. Ceci pourrait avoir des conséquences sur la phosphorylation post-traductionnelle de la protéine tau car c'est l'état de phosphorylation de tau qui joue un rôle sur la stabilité des microtubules.

Ces séquences répétées au niveau des protéines tau présentent beaucoup d'homologie avec les autres MAP, notamment avec la MAP2 qui possède 3 séquences répétitives correspondant aux séquences R1, R3 et R4 de la protéine tau. MAP2 et tau s'associent à des populations différentes de microtubules : la protéine tau se lie aux microtubules axonaux et MAP2 aux microtubules somato-dendritiques, ce qui explique la localisation intraneuronale de ces deux protéines, principalement axonale pour tau et somato-dendritique pour MAP2 (Kosik et Greenberg, 1994). Ceci est démontré notamment par l'observation du développement neuritique dans des cultures primaires de neurones. En effet, les neurites se développant au cours des premières heures suivant la mise en culture sont indifférenciés et contiennent à la fois la protéine tau et la protéine MAP2. Lorsque les neurones commencent à être polarisés, la protéine tau devient prépondérante dans le prolongement d'apparence axonale et la protéine MAP2 ségrège dans les neurites d'apparence dendritique (Kosik et Finch, 1987).

Cette « spécificité » axonale de la protéine tau lui confère un rôle majeur dans la maturation des neurones et l'organisation de la polarité neuronale (voir paragraphe IV-2).



**Figure 16 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de l'isoforme la plus longue de la protéine tau (d'après Buée et al, 2000).**

L'interaction de la protéine tau avec les microtubules est régulée par phosphorylation. En général, une hyperphosphorylation de la protéine tau diminue son affinité pour les microtubules, ce qui peut entraîner leur déstabilisation et par conséquent une désorganisation du cytosquelette. La phosphorylation de tau à des sites spécifiques est un mécanisme prédominant par lequel la fonction de tau est régulée (voir paragraphe II-1). La capacité à se lier et à stabiliser les microtubules est une fonction de tau, et il est devenu de plus en plus évident que la phosphorylation de quelques sites spécifiques joue un rôle dans la régulation des interactions de tau aux microtubules. La phosphorylation des motifs KXGS à l'intérieur des motifs R de tau réduit fortement la liaison, *in vitro*, de tau aux microtubules (Biernat et al, 1993) et probablement aussi *in vivo* (Drewes et al, 1995 ; Biernat et Mandelkow, 1999). Des études *in vitro* ont montré que la phosphorylation de la Ser262 est suffisante pour atténuer de façon significative la capacité de tau à se lier aux microtubules (Biernat et al, 1993). Cependant, la phosphorylation *in situ* (notamment sur les Ser262 et Ser356) de deux motifs KXGS ou plus est nécessaire pour diminuer la liaison aux microtubules (Biernat et Mandelkow, 1999). MARK, PKA et la protéine kinase II calcium/calmodulin-dépendante pourraient contribuer à la phosphorylation de ces sites *in vivo* (Drewes et al, 1995 ; Sironi et al, 1998).

En outre, la phosphorylation de la Thr231 joue aussi un rôle significatif dans la régulation des interactions entre tau et les microtubules. Il a été montré que la Ser235 doit être phosphorylée en premier par GSK-3 $\beta$  pour obtenir une phosphorylation efficace de la Thr231 (Goedert et al, 1994). La phosphorylation de la Thr231 diminue fortement la capacité

de tau à se lier aux microtubules *in situ* (Cho et Johnson, 2003). De plus, quand les lysats cellulaires sont séparés en fractions soluble (cytosol) et insoluble (cytosquelette), presque toutes les protéines tau, qui sont phosphorylées à l'épitope Thr231, sont présentes dans la fraction soluble (Cho et Johnson, 2003 ; Hamdane et al, 2003). Elles ne sont donc plus liées aux microtubules quand elles sont phosphorylées sur cet épitope. De plus, la phosphorylation de la Thr231 inhibe la capacité de tau à stabiliser les microtubules dans les cellules par la réduction des niveaux de tubuline acétylée, un marqueur de stabilité des microtubules (Cho et Johnson, 2004). En revanche, la phosphorylation de tau sur la Ser396 et/ou la Ser404 n'affecte pas de façon significative la capacité de tau à se lier aux microtubules (Cho et Johnson, 2003). La phosphorylation de la Thr231 semble ainsi jouer un rôle clé dans la régulation de la fonction de tau.

## ***2- La maturation des neurones et le transport axonal***

La protéine tau joue probablement un rôle clé dans la régulation de l'extension neuritique (Johnson et Stoothoff, 2004). Les premières études ont démontré que la suppression de l'expression de tau dans les cultures de neurones cérébelleux en utilisant des oligonucléotides antisens, supprime de façon significative la pousse neuritique (Caceres et al, 1991). Une souris knockout (KO) pour tau n'a pas de phénotype évident excepté une diminution du nombre de microtubules dans les axones de petit calibre (Harada et al, 1994). Cette absence de phénotype est probablement due à une redondance de fonction et/ou une compensation par d'autres protéines associées aux microtubules (Harada et al, 1994 ; Dawson et al, 2001). En effet, un double KO de tau et d'une protéine pouvant compenser tau (MAP1B) provoque un désordre important dans le transport axonal. Cela provoque une désorganisation des microtubules dans les cônes de croissance (Takei et al, 2000). De plus, Dawson et collaborateurs en 2001 ont montré que dans les cultures primaires de neurones hippocampiques où tau est absente, le taux d'extension neuritique diminue et la polarisation neuronale est inhibée. Ces défauts sont davantage prononcés dans le modèle double KO tau-MAP-1B (Takei et al, 2000).

Pendant l'axonogenèse, la fonction de tau semble être localement régulée par phosphorylation. Dans le corps cellulaire et dans l'axone proximal, tau est phosphorylée à environ 80% sur les sites Ser199/202 et Thr205. Dans le cône de croissance tau est phosphorylée à environ 20% (Mandell et Banker, 1996).

Tau régule aussi le transport axonal. En effet, le rôle des protéines tau dans la stabilisation des microtubules est également important pour l'établissement et le maintien du transport axonal, essentiel à la vie du neurone (Johnson et Stoothoff, 2004).

Dans des modèles de souris, dans lesquels tau est surexprimée dans le système nerveux central, il y a principalement dans les neurones de la moelle épinière presque toujours une « axonopathie » caractérisée par une dégénérescence de la myéline et des axones, avec des gonflements qui contiennent des éléments du cytosquelette (Ishihara et al, 1999 ; Probst et al, 2000 ; Spittaels et al, 1999). De plus, la surexpression de l'isoforme humaine la plus courte de tau inhibe de façon significative le transport axonal rapide dans les axones de la racine ventrale (Ishihara et al, 1999).

Tau peut inhiber le transport axonal kinésine-dépendant dans différents modèles de culture cellulaire (Stamer et al, 2002 ; Mandelkow et al, 2003 ), et c'est probablement le cas *in vivo* quand tau est surexprimée. Tau, une fois liée aux microtubules, n'a plus d'effet sur la vitesse ou la longueur du déplacement de la kinésine (Seitz et al, 2002). La phosphorylation de tau module son affinité pour les microtubules et ainsi sa capacité à réguler l'activité motrice. Chez les souris double transgéniques pour tau humaine et GSK-3 $\beta$ , la surexpression de GSK-3 $\beta$  augmente de façon significative l'état de phosphorylation de tau et réduit l'axonopathie contrairement aux cas des souris surexprimant seulement la protéine tau humaine. Chez les souris double transgéniques, il y a aussi moins de trouble moteur que chez les souris transgéniques surexprimant seulement la protéine tau humaine (Spittaels et al, 2000). Ceci peut s'expliquer car l'augmentation de la phosphorylation de la protéine tau due à la surexpression de GSK-3 $\beta$  diminue l'affinité de tau pour les microtubules.

## **V- La protéine tau et les maladies neurodégénératives**

Etant donné qu'un certain nombre de maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer, est caractérisé par la présence d'agrégats intracellulaires de protéines tau, elles ont été regroupées sous le terme de « tauopathies ».

Des agrégats de protéines tau sont retrouvés dans le cerveau de patients atteints de multiples affections : la trisomie 21, de nombreux syndromes parkinsoniens (dégénérescence cortico-basale, paralysie supranucléaire progressive [PSP], maladie de Parkinson post-

encéphalitique, syndrome de l'île de Guam), certaines démences fronto-temporales (DFT) telles que la maladie de Pick et les démences fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (DFTP-17), une dystrophie myotonique comme la maladie de Steinert, etc. (Lee et al, 2001 ; Delacourte et Buée, 2000).

Les agrégats de protéines tau peuvent se présenter sous différentes formes (filaments torsadés, filaments droits), et s'accumuler dans différents types cellulaires (neurones, astrocytes, oligodendrocytes). A chaque situation pathologique correspond une distribution laminaire et régionale spécifique d'agrégats de protéines tau. Cette observation indique que différentes sous-populations cellulaires sont affectées dans chaque maladie neurodégénérative.

## ***1- La protéine tau et la maladie d'Alzheimer***

La maladie d'Alzheimer, décrite au début du siècle par Aloïs Alzheimer (Alzheimer, 1907), est une maladie neurodégénérative liée à l'âge, conduisant progressivement et irréversiblement à la perte de la mémoire et des fonctions cognitives. C'est une cause de démence neurodégénérative qui résulte de l'installation progressive, et à l'heure actuelle irréversible, de deux types de lésions dans l'ensemble du cortex cérébral. Ces deux lésions correspondent à deux processus dégénératifs différents, qui se potentialisent pour provoquer la mort neuronale : les plaques séniles ou plaques amyloïdes, qui sont extracellulaires, et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) qui sont intraneuronales (Buée et Delacourte, 2002).

### ***1-1 Les deux principales lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer***

La **dégénérescence neurofibrillaire** correspond à l'envahissement du cytoplasme des neurones, jusqu'à l'extrémité de leurs prolongements, par des fibres microscopiques. Celles-ci sont constituées de filaments appariés en hélice (PHF), dont le composant majeur est la protéine tau anormalement phosphorylée et agrégée (Delacourte et Défossez, 1986). L'agrégation de la protéine tau dans les neurones démarre dans la région hippocampique, zone pivot impliquée dans la gestion de la mémoire. La dégénérescence neurofibrillaire se poursuit ensuite, comme une réaction en chaîne, dans les régions corticales associatives, puis dans l'ensemble du cortex cérébral. Elle se termine par la mort d'un grand nombre de



neurones, entraînant ainsi l'apparition des signes cliniques de perte de mémoire, puis de démence (Braak et Braak, 1998).

Les **plaques amyloïdes** sont des dépôts d'une substance amyloïde constituée d'un polymère d'un fragment protéique de 40 à 42 aa, le peptide  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ). Celui-ci résulte du clivage d'une protéine de grande taille, dite APP (**amyloid protein precursor**). Les plaques, insolubles, se déposent lentement et progressivement dans la totalité du cerveau, mais plus particulièrement autour des méninges, autour des vaisseaux et dans la substance grise du cortex cérébral (Glennner et Wong, 1984). L'APP peut subir deux types de clivage, le premier est dit non-amyloïdogène car il empêche la formation de peptide  $A\beta$  et le second est dit amyloïdogène et il peut avoir lieu dans la voie endosomale-lysosomale. Dans cette voie, une enzyme appelée  $\beta$ -sécrétase clive l'APP ce qui aboutit à la formation d'un gros fragment N-terminal (APP- $\beta$ ) et d'un plus petit fragment C-terminal (C99). Ce dernier fragment est ensuite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase pour générer le peptide  $A\beta$ . Le clivage par la  $\gamma$ -sécrétase est important car il détermine la longueur du peptide  $A\beta$  : l' $A\beta_{42}$  est plus fibrillogène et neurotoxique que l' $A\beta_{40}$  (Leissring et al, 2002).

A l'heure actuelle, il existe un large consensus autour du concept de la cascade de l'amyloïde où la production et l'accumulation du peptide  $A\beta_{42}$  jouent un rôle central dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Hardy et Allsop, 1991 ; Hardy et Selkoe, 2002 ; Citron, 2004). Cette cascade est initiée par la production d' $A\beta_{42}$  qui forme des oligomères puis des agrégats à l'origine des plaques amyloïdes. Les oligomères d' $A\beta_{42}$  peuvent alors endommager directement les synapses et les neurites et entraîner une activation astrocytaire et microgliale. Les oligomères d' $A\beta_{42}$  semblent exercer leurs effets neurotoxiques par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes secondaires, comme la perturbation de l'homéostasie calcique, le stress oxydatif, la lipopéroxydation, l'inflammation et l'excitotoxicité glutamatergique. Ces mécanismes peuvent moduler l'activité de kinases et de phosphatases impliquées dans l'hyperphosphorylation de tau qui se trouve en amont de la formation des DNF. Cela contribuerait à l'extension de la dégénérescence neuronale et suggérerait que la pathologie de tau se situe bien en aval dans la cascade d'événements aboutissant à la dégénérescence neuronale puis à la démence. D'après cette hypothèse, la pathologie de tau n'aurait qu'un rôle potentialisateur dans le développement de la maladie (Figure 17).

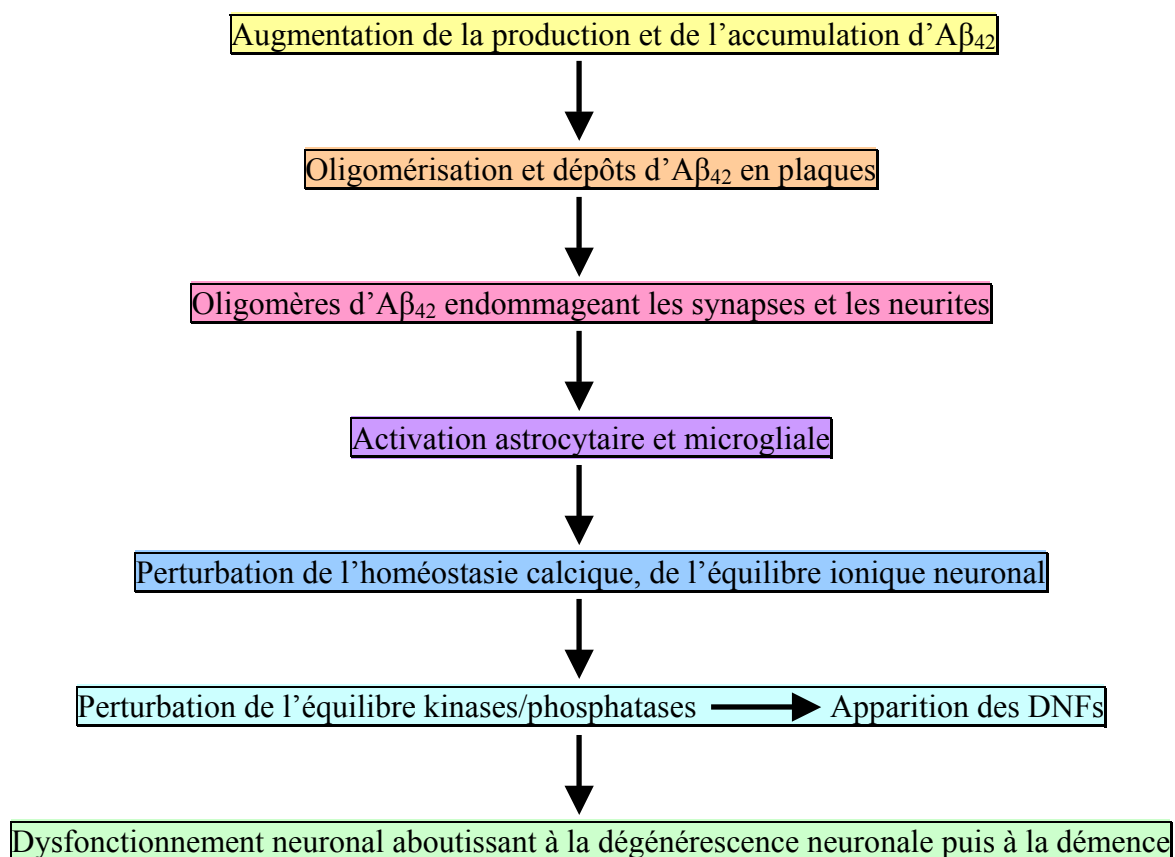


Figure 17 : Hypothèse de la cascade de l'amyloïde (d'après Citron, 2004).

Toutefois un certain nombre de travaux récents a montré que la protéine tau aurait un rôle en amont de la cascade amyloïde (Delacourte et al, 2003 ). Buée et collaborateurs (2000) ont recensé plus de 20 maladies neurologiques avec démence dues directement ou indirectement à une pathologie de tau. De plus, Delacourte et collaborateurs ont montré, après quantification spatio-temporelle des deux lésions de la maladie d'Alzheimer, qu'une pathologie de tau peut exister en l'absence de dépôts amyloïdes dans le cortex entorhinal et l'hippocampe de patients non encore déments. A l'opposé, tous les cas présentant des dépôts amyloïdes développent au moins une pathologie légère de tau (Delacourte et al, 2002).

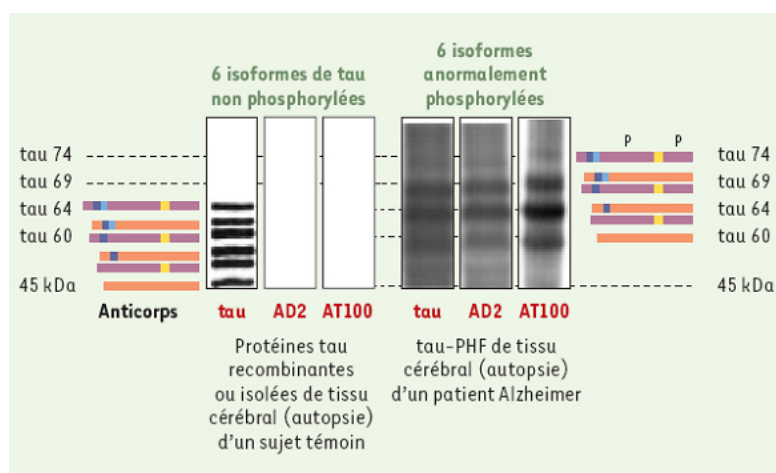
### 1-2 Les protéines tau des PHF

L'examen en microscopie électronique révèle que les dégénérescences neurofibrillaires sont constituées de faisceaux de paires de filaments disposées en hélices, de 10 à 15 nm d'épaisseur avec un pas de 80 nm, appelées **paires hélicoïdales de filaments ou PHF** (Kidd, 1963).

Les PHF sont des structures très insolubles constituées majoritairement de protéines tau appelées tau-PHF. Les protéines tau-PHF se distinguent de la protéine tau normale par leurs propriétés physico-chimiques : elles sont moins solubles dans l'eau, plus acides (Sergeant et al, 1995) et possèdent un poids moléculaire plus élevé (Greenberg et Davies, 1990). Ces différences sont principalement liées à un niveau de phosphorylation plus élevé des tau-PHF (Lee et al, 1991).

### 1-3 Phosphorylation de tau dans les PHF

Les protéines tau isolées des PHF sont anormalement phosphorylées (Figure 18). Les protéines tau-PHF présentes dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer migrent sur un gel d'électrophorèse selon un triplet majeur à 60 (tau 60), 64 (tau 64) et 69 (tau 69) kDa et un variant mineur à 74 kDa (tau 74) (Sergeant et al, 1997). Après déphosphorylation enzymatique, le profil de migration des tau-PHF devient identique à celui de la protéine tau normale : six bandes correspondant aux six isoformes de poids moléculaires échelonnés entre 45 et 65 kDa (Buée et Delacourte, 2002). Cette bande pathologique de 74 kDa correspond à l'hyperphosphorylation de l'isoforme la plus longue de la protéine tau (4R et les deux inserts N-terminaux) (Sergeant et al, 1997).



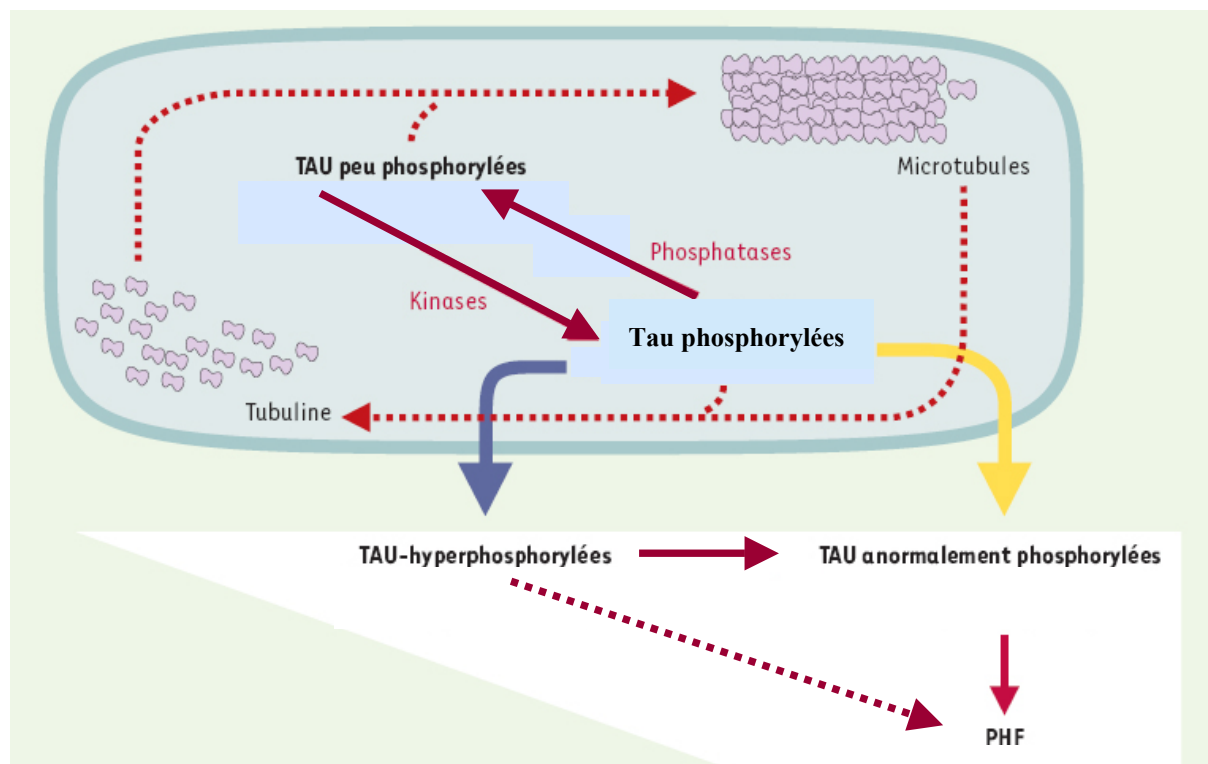
**Figure 18 : Isoformes des protéines tau et mobilité électrophorétique : influence de la phosphorylation (d'après Buée et Delacourte, 2002).**

L'étude de la pathologie neurofibrillaire de patients décédés à différents stades de la maladie et de sujets âgés considérés comme intellectuellement normaux a permis de définir

un ordre chronologique dans lequel apparaissent les lésions. La première aire corticale à être affectée par les DNF est le cortex entorhinal. Puis les lésions sont observées dans l'hippocampe et le cortex rétrosplénial. La pathologie neurofibrillaire intéresse ensuite la partie antérieure du lobe temporal. Puis, ce sont les aires associatives uni- puis multimodales frontales et temporo-pariéto-occipitales qui sont concernées. En dernier lieu, les aires primaires (motrice, somesthésique, auditive, visuelle) sont atteintes (Braak et Braak, 1998 ; Delacourte et al, 1998).

L'hyperphosphorylation des protéines tau dans la MA semble liée soit à l'augmentation de l'activation des kinases soit à la diminution de l'activation des phosphatases (Trojanowski et Lee, 1995) (Figure 19). Plusieurs kinases pourraient être impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau telles que la GSK-3 $\beta$  (Lovestone et Reynolds, 1997). En effet, l'anticorps AT-100 qui se fixe sur un épitope sur la protéine tau « pathologique » spécifique de la MA, est visualisé *in vitro* après une séquence complexe de phosphorylation par GSK-3 $\beta$  et PKA (Zheng-Fischhofer et al, 1998). Certaines kinases de la famille des SAPK (**s**tress-**a**ctivated **p**rotein **k**inases) pourraient aussi être impliquées dans la phosphorylation des protéines tau-PHF (Jenkins et al, 2000).

Les phosphatases semblent également jouer un rôle important dans le niveau de phosphorylation des protéines tau-PHF (Figure 19). En effet, certaines données suggèrent que l'activité des phosphatases pourrait diminuer dans les cerveaux alzheimeriens (Gong et al, 1995 ; Ladner et al, 1996). En effet, les phosphatases PP2A, PP2B et PP1 sont capables de déphosphoryler une partie des sites sérine phosphorylés dans les tau-PHF. Une telle déphosphorylation de la protéine tau-PHF restaure son activité biologique *in vitro* : elle redevient capable de promouvoir à la fois la nucléation et l'assemblage des microtubules (Wang et al, 1996b).



**Figure 19 : La phosphorylation normale et pathologique de la protéine tau dans la MA (d'après Buée et Delacourte, 2002).**

En résumé, le degré de phosphorylation de la protéine tau semble dépendre de l'équilibre entre plusieurs kinases et phosphatases. L'hyperphosphorylation de la protéine tau semble suffisante pour modifier ses propriétés fonctionnelles : elle diminue non seulement l'affinité de la protéine pour les microtubules mais il a aussi été montré que les isoformes phosphorylées se lient aux protéines tau normales au niveau de leur région de fixation aux microtubules, empêchant secondairement l'assemblage des microtubules. Cette co-agrégation de protéines tau-PHF et de protéines tau normales provoque la formation d'amas fibrillaires *in vitro* (Alonso et al, 1994). De plus, les protéines tau-PHF s'agrègent aux MAP1 et 2 : la séquestration de ces protéines, comme celle de la protéine tau normale, inhibe leur capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules (Alonso et al, 1997). Cependant, d'autres facteurs pourraient être impliqués dans l'agrégation de ces protéines tau comme l'ubiquitinylation, la glycation et l'oxydation.

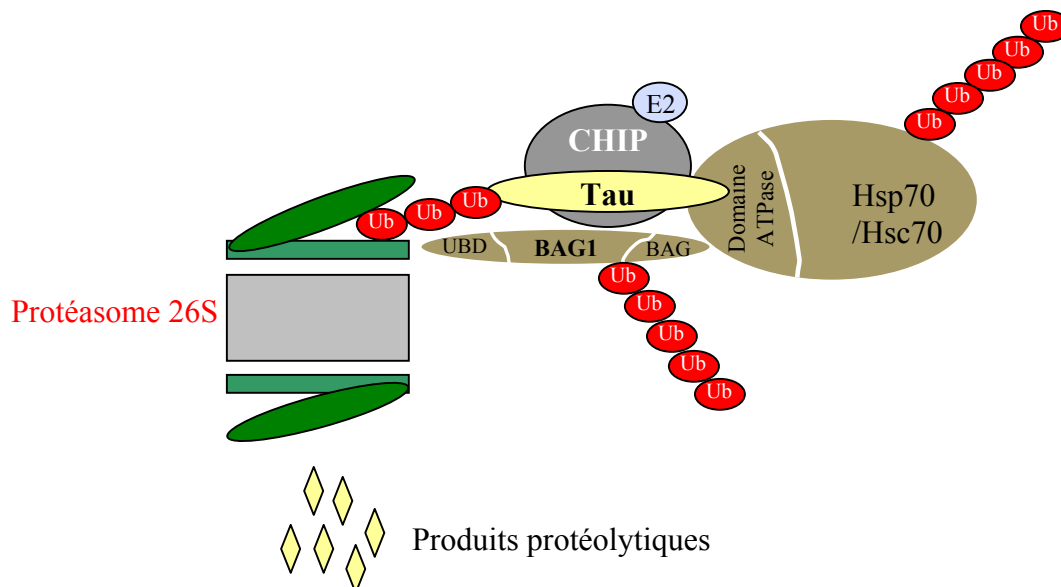
## **1-4 Autres modifications post-traductionnelles dans les protéines tau-PHF**

- **Ubiquitinylation**

L'ubiquitinylation est un processus cellulaire par lequel les protéines mal repliées ou altérées sont conjuguées avec une chaîne polymérique d'ubiquitine (Ub), ce qui conduit ces protéines à la dégradation protéasomale. Ce phénomène de conjugaison nécessite un système de cascade enzymatique qui inclut l'enzyme d'activation E1-Ub, l'enzyme de conjugaison E2-Ub et la ligase E3-Ub. L'implication du système Ub-protéasome dans les maladies neurodégénératives est soutenue par plusieurs observations. Premièrement, les DNF extraites de cerveaux alzheimeriens révèlent que la protéine tau est associée à des molécules d'ubiquitine (Iqbal et Grundke-Iqbal, 1991). Deuxièmement, dans les cerveaux alzheimeriens *post mortem*, l'activité du protéasome est diminuée ou s'affaiblit et, une mutation du gène codant pour l'ubiquitine a été montrée dans la MA (De Vrij et al, 2001).

De plus, une colocalisation de tau et de l'ubiquitine a été observée dans les DNF chez les souris transgéniques exprimant l'isoforme humaine *htau44* (Ishihara et al, 2001). Dans les souris transgéniques P301L, les lésions neuronales sont fortement immunoréactives pour l'ubiquitine (Lewis et al, 2000). Chez les souris R406W (mutées pour tau), seulement une partie des neurones tau-positifs l'est aussi pour l'ubiquitine (Tatebayashi et al, 2002). Au contraire, dans les neurones des souris P301S formant des DNF aucun marquage pour l'ubiquitine n'a été révélé (Allen et al, 2002).

Des données récentes ont montré que le complexe Hsp70/CHIP joue un rôle important dans la régulation physiologique de la protéine tau mais également dans l'élimination de la protéine tau anormale. En effet la protéine CHIP, une ubiquitine ligase qui interagit avec la protéine Hsp70, induit l'ubiquitinylation de la protéine tau et la mène à sa protéolyse (Figure 20). Cependant CHIP peut également contribuer à l'agrégation de la protéine tau après l'avoir ubiquitinylée (Petrucci et al, 2004). Il a également été montré que les complexes Hsp70/CHIP et Hsp27/CHIP réduisent la toxicité de la protéine tau phosphorylée et pourraient ainsi conférer à la cellule des propriétés anti-apoptotiques (Kosik et Shimura, 2005).



**Figure 20 : Ubiquitinylation de la protéine tau par des protéines chaperonnes CHIP/HSP70 (d'après Andermarcher et al, 2005).** CHIP : carboxy terminus of Hsp70-interacting protein ; Bag: Bcl-2-associated athanogene; UBD : domaine ubiquitin-like; Ub : ubiquitine; E2: ubiquitin-conjugating enzyme.

- **Glycosylation**

Les tau-PHF extraites des cerveaux de patients présentent une O- et une N-glycosylation que l'on ne retrouve pas dans les cerveaux témoins (Comer et Hart, 2000 ; Liu et al, 2002). Cette modification post-traductionnelle réduit l'affinité de la protéine tau pour la tubuline. La O-glycosylation semble jouer un rôle dans la localisation et la dégradation des protéines tau (Kamemura et Hart, 2003 ; Lefebvre et al, 2003).

En effet, l'accumulation d'AGE est impliquée chez les personnes âgées et dans les cas de pathologies telles que le diabète et la MA. L'utilisation d'anticorps AGE spécifiques a montré que les tau-PHF subissent une glycation (Munch et al, 2003). Les sites de glycation ont été identifiés sur des lysines des protéines tau 4R et 3R. Cette glycation pourrait contribuer à la formation des NFT insolubles (Nacharaju et al, 1997).

Il y a également d'autres modifications post-traductionnelles qui peuvent être impliquées dans l'agrégation de ces protéines tau comme la nitration ou la sulfatation (voir paragraphe II2). Le stress oxydatif est un potentiel mécanisme pathogénique dans la maladie d'Alzheimer. La nitration des résidus tyrosine dans les protéines médiée par la peroxy-nitrite est un de ces mécanismes. La peroxy-nitrite est le produit de la réaction entre un oxyde de nitrite et des radicaux superoxydes. La présence de nitrotyrosine dans les NFT a été démontrée (Good et al, 1996). Chez les patients alzheimeriens, la concentration de

nitrotyrosine est six fois plus importante que chez les personnes normales (Tohgi et al, 1999). De plus, des immunomarquages ont permis de montrer la présence de résidus nitrés et de thio-S-flavine dans les protéines tau agrégées générées dans la lignée oligodendrocytaire après un traitement à la peroxy-nitrite. Ceci implique que la nitration et la sulfatation ont un lien direct avec la formation des inclusions filamenteuses de tau (Horiguchi et al, 2003).

Par ailleurs, Gamblin et collaborateurs (2003) ont montré qu'un clivage de la protéine au niveau de l'aspartyl en position 421 avait lieu. Ils l'ont mis en évidence dans les cerveaux de patients atteints de la MA par immunohistochimie en utilisant l'anticorps Tau-C3 et ils ont montré que la capacité de la protéine tau à former des fibrilles est augmentée par ce clivage.

### ***1-5 Agrégation de la protéine tau-PHF***

Une des principales différences entre les protéines tau-PHF et la protéine tau normale est que la protéine tau-PHF est agrégée. L'existence de polymères insolubles de protéine tau pathologique dans les cerveaux alzheimeriens est démontrée par la présence de marquages diffus (« smear ») après migration électrophorétique (en plus des bandes pathologiques caractéristiques). Ces marquages diffus ne sont pas observés sur des échantillons cérébraux normaux issus de biopsie (Delacourte et Buée, 1997). Cette agrégation des tau-PHF rend probablement inaccessible aux phosphatases un certain nombre de sites phosphorylés. Ceci pourrait expliquer pourquoi la protéine tau des cerveaux alzheimeriens demeure phosphorylée contrairement à celle des cerveaux normaux traités avec un délai *post mortem* identique (Matsuo et al, 1994 ; Delacourte et Buée, 1997).

Il existe une relation directe entre la phosphorylation anormale et l'agrégation de tau mais il reste encore à déterminer si la phosphorylation est une cause ou une conséquence du processus d'agrégation.

### ***1-6 Localisation de la protéine tau-PHF***

Dans le cerveau normal, la protéine tau est essentiellement axonale alors que dans les cerveaux de patients alzheimeriens, la protéine tau s'accumule dans le corps cellulaire neuronal où elle forme les DNF. Elle est aussi retrouvée dans les dendrites (Braak et Braak, 1988). L'accumulation de protéine tau pathologique dans les dendrites et les axones les



transformerait en neurites dystrophiques, très largement observés dans les cerveaux des patients alzheimeriens (Kowall et Kosik, 1987 ; Ihara, 1988).

Des accumulations de la protéine tau pathologique sont aussi retrouvées dans le milieu extracellulaire. Ces formations appelées PHF fantômes persistent dans le neuropile après la mort neuronale grâce à leur insolubilité (Iqbal et al, 1998).

## ***2- La protéine tau et les autres tauopathies***

L'agrégation de tau n'est pas seulement retrouvée dans la maladie d'Alzheimer, elle a également été décrite dans de nombreuses autres affections neurodégénératives.

La découverte de formes familiales de démences frontotemporales résultant de mutations sur le gène tau a permis de mieux comprendre comment les protéines tau pouvaient participer au mécanisme de neurodégénérescence neurofibrillaire.

### ***2-1 Les maladies neurodégénératives associées au triplet pathologique de la protéine tau***

L'étude du profil électrophorétique de tau dans les homogénats de cerveaux de malades confirme la présence de protéines tau pathologiques dans un certain nombre d'affections neurodégénératives associées à une démence. En effet, un triplet de protéines tau pathologiques identique à celui de la MA (55, 64 et 69 kDa) est retrouvé dans le syndrome de Down, dans le syndrome de l'Ile de Guam et dans la maladie de Parkinson avec démence.

- **Le syndrome de Down ou trisomie 21**

Dû à la trisomie 21, les patients atteints du syndrome de Down (DS) présentent un retard mental qui se caractérise sur le plan neuropathologique par de grandes similarités avec la MA. Chez la quasi totalité des patients, la formation de DNF et de dépôts amyloïdes apparaît avant la perte neuronale. Une forte densité de dépôts amyloïdes diffus est observée après l'âge de 15 ans, suivi par l'apparition de nombreuses plaques séniles dans la décennie suivante de la vie. La dégénérescence neurofibrillaire avec une accumulation de protéines tau apparaît ensuite (Hof et al, 1995). En utilisant une approche électrophorétique, il a été montré que les extraits de cerveaux de patients atteints du DS contenaient une quantité significative de protéine tau

insoluble. Cette insolubilité est corrélée à une phosphorylation anormale de tau, comme cela a déjà été montré dans les triplets pathologiques de la MA (Hanger et al, 1991).

- **Le syndrome de l'Ile de Guam**

Cette maladie, présentant une forte prévalence dans certaines populations des îles du Pacifique Ouest, pourrait être liée à un facteur étiologique majeur : la consommation alimentaire de neurotoxines contenues dans la noix de Cycad (Garruto, 1991). Sur le plan clinique, cette maladie se caractérise par l'association d'une sclérose latérale amyotrophique, d'un syndrome parkinsonien et d'un syndrome démentiel. Sur le plan neuropathologique, on retrouve de nombreuses dégénérescences neurofibrillaires particulièrement dans les isocortex frontal et temporal et dans les aires sous corticales. On retrouve le même triplet pathologique que la MA (55, 64 et 69 kDa) bien que ce triplet dans le syndrome de l'Ile de Guam se trouve non seulement dans les régions corticales (comme dans la MA) mais également dans les aires sous corticales (Buée-Scherrer et al, 1995).

- **La maladie de Parkinson**

Sur le plan neuropathologique, cette maladie se caractérise par une perte neuronale et la présence d'inclusions nommées corps de Lewy (Forno, 1996). Chez les patients présentant ces corps de Lewy, il n'y a pas de protéine tau pathologique. C'est pourquoi, cette maladie n'est pas considérée comme une réelle tauopathie. Cependant, chez des patients ne présentant pas ces corps de Lewy, la présence de protéine tau pathologique a été décrite par Vermersch et collaborateurs (1993) en utilisant l'approche par western blot. En effet, ils ont détecté la présence du triplet pathologique de type MA dans les aires corticales avec une prédominance au niveau du cortex préfrontal (Vermersch et al, 1993).

## ***2-2 Les maladies neurodégénératives associées à des protéines tau différentes***

D'autres maladies neurodégénératives sont associées à la présence de protéines tau pathologiques présentant un profil de migration différent de celui de la MA. C'est le cas notamment de la paralysie supranucléaire progressive, de la dégénérescence cortico-basale et des démences fronto-temporales.

- **La paralysie supranucléaire progressive (PSP)**

Cette maladie a été décrite par Steele, Richardson et Olszewski en 1964 (Steele et al, 1964). Sur le plan neuropathologique, la PSP se caractérise par une perte neuronale et la formation de DNF. La présence des DNF est constante au niveau du néocortex frontal et des noyaux du tronc cérébral. Les caractéristiques immunohistochimiques de ces lésions sont identiques à celles de la MA. Cependant, les études ultrastructurales montrent que cette dégénérescence neurofibrillaire n'est pas formée de PHF mais de filaments droits (Tomonaga, 1977). Ces filaments droits sont formés, comme les PHF, essentiellement de protéines tau. Le profil électrophorétique de la protéine tau pathologique dans la PSP est légèrement différent de celui trouvé dans la MA car on trouve un doublet pathologique (64 et 69 kDa) au lieu du triplet trouvé dans la MA. Une bande mineure de 74 kDa est également retrouvée. Ceci suggère donc une phosphorylation anormale de la protéine tau (Vermersh et al, 1994).

- **La dégénérescence cortico-basale (CBD)**

La CBD est une maladie neurodégénérative rare, sporadique et à progression lente. Sur le plan neuropathologique, on retrouve une DNF présente au niveau du cortex pariétal et des noyaux gris centraux. Ces lésions sont, comme pour la PSP, formées de filaments droits et non de PHF. La protéine tau constituant ces filaments montre un profil de migration électrophorétique identique à celui de la PSP avec un doublet pathologique de 64 et 69 kDa (Buée-Scherrer et al, 1996).

- **Les démences fronto-temporales (DFT)**

Les DFT constituent la deuxième cause de démence dégénérative après la MA. Elles peuvent être classées selon des critères neuropathologiques et notamment selon l'atteinte neurofibrillaire et les anomalies de la protéine tau (Pasquier et Lebert, 1998) :

- **La maladie de Pick**

Cette maladie est une forme neurodégénérative rare caractérisée par une démence progressive. Sur le plan neuropathologique, il n'existe pas de DNF mais des inclusions neuronales sphériques appelées corps de Pick. Ces lésions sont constituées de filaments droits désorganisés formés essentiellement de protéine tau. La migration électrophorétique montre l'apparition d'un doublet pathologique de protéine tau à 55 et 64 kDa qui semble spécifique

de la maladie de Pick (Delacourte et al, 1996). Ces protéines tau pathologiques sont uniquement constituées d'isoformes 3R. Ceci suggérerait donc que la formation de ces corps de Pick pourrait survenir spécifiquement dans certaines populations neuronales n'exprimant pas la 4<sup>ème</sup> séquence répétitive codée par l'exon 10 (Delacourte et al, 1998).

#### - **La dégénérescence aspécifique du lobe fronto-temporal**

Cette pathologie mène à la démence (Gustafson, 1993). Sur le plan clinique les symptômes sont assez similaires à ceux observés dans la maladie de Pick avec des troubles de la parole. Sur le plan neuropathologique, il n'existe pas de DNF ni de corps de Pick. Une perte neuronale apparaît dans les couches superficielles des cortex frontal et temporal (Brun et al, 1994). Cependant, l'analyse électrophorétique de la protéine tau peut retrouver le triplet pathologique de type Alzheimer en faible quantité au niveau des aires frontale et temporale (Vermersh et al, 1995).

#### - **La démence fronto-temporale avec Parkinson liée au chromosome 17**

Sur le plan neuropathologique, les FTDP-17 sont caractérisées par une atrophie corticale fronto-temporale. La perte neuronale est importante, essentiellement dans les couches corticales superficielles et dans la substance noire. Des inclusions tau-PHF sont observées, selon les familles, soit exclusivement dans les neurones, soit dans les neurones et dans les cellules gliales du néocortex et de certaines structures sous-corticales. Enfin, il n'y a, en général, pas de dépôts amyloïdes.

Actuellement, une vingtaine de mutations différentes de tau a été mise en évidence chez les patients atteints d'une FTDP-17 (pour revue voir Lee et al, 2001 ; Delacourte et Buée, 2000 ; Buée et al, 2000). Elles ségrègent toujours avec la maladie, et ne sont jamais retrouvées chez les sujets témoins, soulignant l'implication directe des protéines tau mutées dans le processus pathogénique. En effet, les mutations sont localisées soit dans la partie codante du gène des protéines tau, soit dans la séquence intronique qui suit l'exon 10. Les mutations exoniques sont situées dans la séquence codant pour le domaine de liaison aux microtubules, ou à proximité immédiate (Delacourte et Buée, 2000 ; Buée et al, 2000 ; Lee et al, 2001).

Une classification de ces mutations peut être établie sur la base de leurs conséquences fonctionnelles :

- un premier groupe, comprenant la plupart des mutations non-sens situées dans le domaine de liaison aux microtubules, a pour effet de modifier la capacité de liaison des protéines tau aux microtubules (Lee et al, 2001 ; Delacourte et Buée, 2000 ; Buée et al, 2000)
- les mutations du deuxième groupe, correspondant aux mutations introniques plus quelques mutations exoniques, ont pour effet de modifier l'épissage de l'exon 10, et donc de changer la proportion des isoformes tau-4R par rapport aux isoformes tau-3R (Lee et al, 2001 ; Delacourte et Buée, 2000 ; Buée et al, 2000).

L'étude *in vitro* de l'effet des mutations non-sens du premier groupe montre que les protéines tau mutées se lient moins aux microtubules et ne permettent pas une bonne polymérisation de la tubuline aux microtubules. Cela a été récemment vérifié *in situ*, par des travaux montrant que la plupart des mutations non-sens, à l'exception de la mutation R406W, ne modifient pas la phosphorylation des protéines tau mais bien leur liaison aux microtubules (Delobel et al, 2002).

Lorsque la mutation est située dans la région exonique commune aux six isoformes, et en dehors de l'exon 10, les six isoformes perdent leur fonctionnalité. Elles s'agrègent alors sous forme de PHF et de filaments identiques à ceux observés au cours de la MA. L'analyse biochimique montre un profil électrophorétique de type « triplet MA » tau 60, 64 et 69 (Lee et al, 2001 ; Delacourte et Buée, 2000 ; Buée et al, 2000).

Lorsque la mutation non-sens est localisée dans l'exon 10 (P301L, P301S), seules les isoformes tau-4R sont affectées et perdent leur capacité de liaison aux microtubules. Elles s'agrègent alors pour former des filaments torsadés au sein des neurones et des cellules gliales. Le profil électrophorétique est un doublet de « type PSP » tau 64 et 69 (Lee et al, 2001 ; Delacourte et Buée, 2000 ; Buée et al, 2000).

Enfin, il existe un certain nombre de maladies neurodégénératives associées à des troubles cognitifs sévères qui semble totalement dépourvu de lésions neurofibrillaires et d'anomalies de la protéine tau. C'est le cas notamment de la Chorée de Huntington et de la démence à corps de Lewy diffus.

### ***3- Les modèles transgéniques de tauopathies***

L'étiologie de la maladie d'Alzheimer est complexe, c'est pourquoi des modèles d'animaux transgéniques ont été développés afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de cette maladie. Des modèles transgéniques surexprimant l'APP muté ont été développés chez la souris (Games et al, 1995 ; Calhoun et al, 1998 ; Stalder et al, 1999), le hamster (Mullan et al, 1992), la drosophile (Rosen et al, 1989) ...

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux modèles transgéniques de souris exprimant ou non la protéine tau. Les premières souris transgéniques surexprimant la protéine tau humaine ont été développées en 1995 (Götz et al 1995), bien avant la découverte de mutations pathogéniques de tau. Ces modèles reproduisent certains aspects de la MA, comme la localisation somatodendritique de tau hyperphosphorylée qui constitue l'étape précédant la formation des DNF. Pour cela, l'isoforme la plus longue de tau (4R) a été surexprimée. Les agrégats de tau peuvent être facilement marqués par des anticorps anti-tau dépendant de la phosphorylation et de la conformation de la protéine (Götz, 2001a). Malgré la diminution de la solubilité de tau, aucune formation de DNF n'est apparue (Ishihara et al, 2001).

Spittaels et collaborateurs ont élaboré un modèle de souris transgénique similaire à celui de l'équipe de Götz et ont rapporté que la surexpression de protéines tau provoque une axonopathie qui est liée au niveau d'expression du transgène de tau. Une surexpression de tau 2 ou 3 fois supérieure à la normale dans le cerveau et dans la moelle épinière de ces souris transgéniques provoque une redistribution somatodendritique de tau (Spittaels et al, 1999)

Avec l'identification en 1998, des mutations de tau dans la FTDP-17, plusieurs groupes de chercheurs ont réussi à obtenir des DNF, à la fois dans les neurones (Lewis et al, 2000) et dans les cellules gliales des souris transgéniques surexprimant des mutants de la protéine tau (Higuchi et al, 2002 ; Kins et al, 2003). Ces souris développent un déficit moteur et des troubles du comportement. Les DNF sont détectées dans le cerveau et la moelle épinière (Lewis et al, 2000). Les souris expriment l'isoforme la plus courte de protéine tau mutante P301L dans le modèle de Lewis et collaborateurs (2000) et l'isoforme la plus longue de tau mutante P301L dans le modèle de Götz et collaborateurs (2001a). Dans un autre modèle de souris exprimant la mutation de tau P301S, une expression de tau élevée dans la moelle

épinière a été observée et la moitié des motoneurones meurent (Allen et al, 2002). Des souris double transgéniques P301L (mutation de tau) et Tg2576 (production de A $\beta$ ) ont été créées et elles développent à la fois des plaques A $\beta$  et des DNF (Götz et al, 2001b). Oddo et collaborateurs en 2003 ont développé un autre modèle de souris transgénique combinant trois mutations : la mutation APP (souris 3xTg-AD), la mutation PS1 (M146V) et la mutation tau (P301L). Ces souris développent des plaques et des DNF mais surtout elles miment le développement de la pathologie de la MA (Oddo et al, 2003). L'injection d'anticorps anti-A $\beta$  à ces souris réduit non seulement les plaques extra-cellulaires, mais aussi les dépôts intracellulaires d'A $\beta$  et surtout la pathologie de tau. La clairance de cette dernière est médiée par le protéasome. Toutefois, une fois les DNF bien formées, il est impossible de les supprimer (Oddo et al, 2004).

Par ailleurs, il a été montré qu'un traitement chronique par le lithium diminue également la phosphorylation de tau dans les modèles de souris mimant la démence fronto-temporale de Parkinson liée au chromosome 17 (FTDP-17) où tau mutée est surexprimée (Perez et al, 2003). Ces résultats et d'autres découvertes ont permis de mettre en évidence que la protéine tau est un substrat *in vivo* de GSK-3 $\beta$ , et que la phosphorylation anormale de tau par GSK-3 $\beta$  pourrait conduire aux processus pathogéniques observés dans les cerveaux des malades atteints de la MA. En effet, des phosphorylations séquentielles de tau par PKA et GSK-3 $\beta$  produisent des protéines tau similaires à celles trouvées dans la maladie d'Alzheimer (Perez et al, 2003).

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

## **PARTIE 3 : LA PROTEINE TAU ET LA MORT NEURONALE**

En interagissant avec les microtubules *via* son domaine spécifique de liaison aux microtubules, la protéine tau favorise leur assemblage et leur stabilité et, par conséquent, stabilise le cytosquelette (Johnson et Jenkins, 1999). Or, une perturbation du cytosquelette intervient au cours de l'apoptose neuronale, indiquant que des modifications de l'état de phosphorylation de la protéine tau peuvent jouer un rôle important dans la mort neuronale par apoptose. La question qui se pose est alors : les modifications de l'état de phosphorylation de tau sont-elles causes ou conséquences de l'apoptose ?

### **I- Modifications de l'état de phosphorylation de la protéine tau au cours de l'apoptose**

La régulation de l'état de phosphorylation de la protéine tau résulte des activités conjointes de protéines kinases et de protéines phosphatases (Billingsley et Kincaid, 1997). Tanaka et collaborateurs, en 1998, ont démontré que les protéines phosphatases et particulièrement la protéine phosphatase 2A (PP2A) et la protéine phosphatase 1 (PP1), régulent les activités de quelques protéines kinases qui phosphorylent la protéine tau. Parmi ces kinases, la glycogène synthétase kinase-3 et particulièrement l'isoforme glycogène synthétase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) est impliquée dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Baum et al, 1995).

Etant donné le rôle de la protéine tau dans la stabilisation des microtubules, il n'est pas surprenant que les changements des états de phosphorylation de la protéine tau (qui altèrent sa liaison aux microtubules) jouent un rôle important dans le destin cellulaire. En fait, quelques études ont montré que la protéine tau est hyperphosphorylée pendant l'apoptose neuronale et que cette phosphorylation, due à une dérégulation de certaines kinases, provoque la



diminution de la liaison de la protéine tau aux microtubules (Davis et Johnson, 1999 ; Zhang et Johnson, 2000).

Les résultats de certaines études précédentes (Miles et Pittman, 1995 ; Lesort et al, 1997 ; Mills et al, 1998 ; Canu et al, 1998) ont démontré que l'apoptose était associée à l'augmentation de la déphosphorylation de tau. En effet, il a été montré que sur des cellules PC12, l'apoptose neuronale induite par suppression de NGF est associée à une déphosphorylation de la protéine tau au niveau du site tau-1 (Miles et Pittman, 1995). Puis, Lesort et collaborateurs ont induit l'apoptose dans des cultures corticales de rat par une exposition prolongée (16 heures) à une faible concentration de NMDA (20  $\mu$ M), ou par privation de facteurs trophiques. Ils ont montré, *in situ*, une augmentation du pourcentage de neurones apoptotiques immunomarqués par tau-1 (anticorps détectant la protéine tau déphosphorylée) par rapport au contrôle. Ceci suggère que les neurones exprimant la protéine tau déphosphorylée au niveau du site tau-1 sont plus sensibles à l'apoptose induite par une exposition prolongée au NMDA ou par une privation de sérum. Ces découvertes ont ensuite été confirmées par l'étude de l'apoptose dans des lignées cellulaires humaines (Mills et al, 1998) et dans les cultures de cellules en grain du cervelet de rat (Canu et al, 1998). Mills et collaborateurs (1998) ont démontré que la déphosphorylation de la protéine tau est spécifique de la phase d'exécution de l'apoptose dans les cellules PC12 différenciées. Cette déphosphorylation peut être inhibée par de faibles concentrations (20 nM) d'inhibiteur des phosphatases : l'acide okadaïque (OKA), indiquant que les phosphatases comme PP2A pourraient être responsables de la déphosphorylation de tau. En utilisant des cultures de cellules en grain du cervelet privées de sérum ou de potassium, Canu et collaborateurs (1998) ont étudié les effets de l'apoptose sur les microtubules et la protéine tau. Ils ont montré qu'une diminution de la quantité de cette protéine ainsi qu'une diminution de sa phosphorylation apparaissaient au cours de l'apoptose.

## **II- Clivage protéolytique de la protéine tau au cours de l'apoptose**

La déphosphorylation de la protéine tau sur l'épitope tau-1, observée par Canu et collaborateurs en 1998, est associée au clivage de tau donnant naissance à un fragment final

de 17 kDa déphosphorylé. Ils ont montré que ce clivage était caspase-dépendant en inhibant l'apparition de ce fragment à 80-90% par un inhibiteur général des caspases mais également que ce clivage était calpaïne-dépendant en inhibant les calpaïnes et le protéasome. De plus, ce fragment est déphosphorylé, car seul l'anticorps anti-tau déphosphorylé (Tau-1) est capable de le détecter (Canu et al, 1998). Or, la protéolyse de protéines cellulaires est aussi un des mécanismes cruciaux de l'apoptose (Salvesen et Dixit, 1997).

Puis, plus récemment une autre équipe (Chung et al, 2001), a démontré que le clivage de tau apparaissait au cours de l'apoptose neuronale induite par la staurosporine dans des cultures de neurones corticaux. Ils ont montré que ce clivage, induit par la staurosporine, pouvait être bloqué par 20  $\mu$ M de z-Asp-Glu-Val-Asp-chloromethylketone, un inhibiteur de la caspase-3. Ils ont montré que la partie C-terminale de tau est clivée par la caspase-3, *in vivo* et *in vitro*, pour générer une isoforme tronquée ( $\Delta$ tau) qui semble contribuer au programme de mort cellulaire. Ils ont émis l'hypothèse qu'il existait deux sites potentiels de clivage par la caspase-3 sur la protéine tau du côté C-terminal au niveau des aspartates 348 et 421. Pour cela ils ont construit deux mutants pour lesquels les aspartates ont été substitués par des glutamines et ils ont ainsi montré que la protéine tau était clivée seulement au niveau de l'Asp<sup>421</sup>. Ce clivage mène à l'apparition d'un fragment de 50 kDa qui représente les résidus 1 à 421 (Figure 21). Cependant, en plus du site Asp<sup>421</sup>, la protéine tau possède un deuxième site putatif de clivage par les caspases, le site Asp<sup>348</sup>. Le clivage à ce niveau du fragment 1-421 devrait générer un fragment de 73 résidus dont le poids moléculaire calculé serait de 9 kDa (Figure 21).

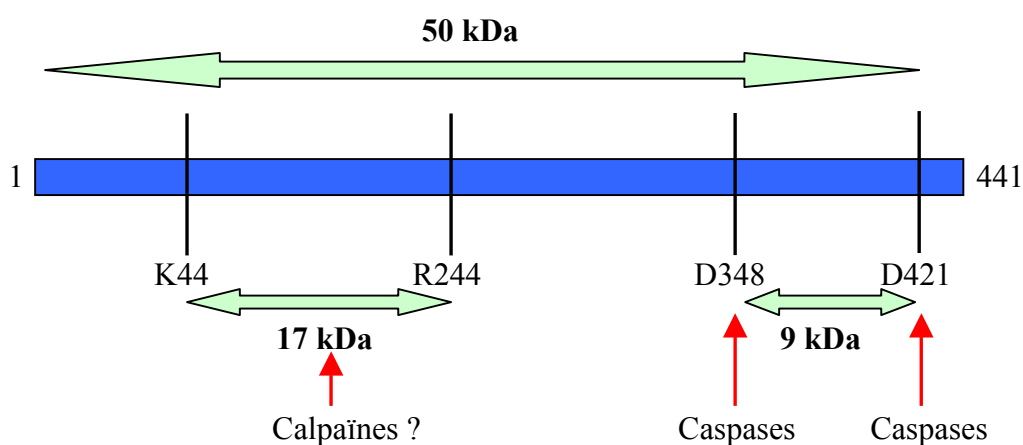


Figure 21 : Fragments générés après clivage de la protéine tau.

Chung et collaborateurs (2001) ont également montré que la protéine précurseur de l'A $\beta$  (APP) augmente la capacité de la protéine tau, tronquée au niveau du résidu aspartyl en position 421, à induire la mort cellulaire. Ces données ont été récemment confirmées par Gamblin et collaborateurs en 2003. Leur étude révèle que le clivage de tau apparaît au cours de l'apoptose dans des cultures de neurones exposés au peptide  $\beta$ -amyloïde (1-42). Ce clivage se fait par des caspases et génère une protéine tau tronquée où il manque les 20 derniers acides aminés C-terminaux. La protéine tau tronquée correspond à un fragment de 50 kDa et possède une meilleure capacité à s'assembler en filaments par rapport à la forme entière de tau. La protéine tau est rapidement clivée dans les neurones traités par A $\beta$  et cette protéolyse semble précéder les événements nucléaires apparaissant au cours de l'apoptose. Ils ont également démontré que la protéine tau tronquée sur l'Asp<sup>421</sup> est aussi clivée sur ce site dans la maladie d'Alzheimer (Gamblin et al, 2003). Ceci indique l'existence d'un lien entre la pathologie de l'amyloïde et celle de tau.

Ces deux études montrent que le fragment de 50 kDa peut être détecté par l'anticorps Tau-5. Celui-ci réagit avec les résidus 210-230 de tau indépendamment de ses états de phosphorylation (Chung et al, 2001 ; Gamblin et al, 2003). Ce fragment a aussi été détecté de façon spécifique par Tau-C3, un anticorps monoclonal reconnaissant les fragments clivés de tau dirigé contre les résidus 412-421 (Gamblin et al, 2003).

Ainsi, l'activation des caspases, comme la caspase-3 par exemple, pourrait constituer un lien entre la pathologie de l'amyloïde et celle de la protéine tau. En effet, Rissman et collaborateurs, en 2004, ont montré qu'après un stimulus (par A $\beta$ <sub>1-42</sub>) provoquant l'activation des caspases, tau est clivée au niveau de l'Asp<sup>421</sup> (étape I). Puis, suite au clivage, tau tronquée ( $\Delta$ tau) change de conformation (étape II) ce qui mène à l'activation de la formation des filaments et à l'agrégation de tau (étape III) (Figure 22).

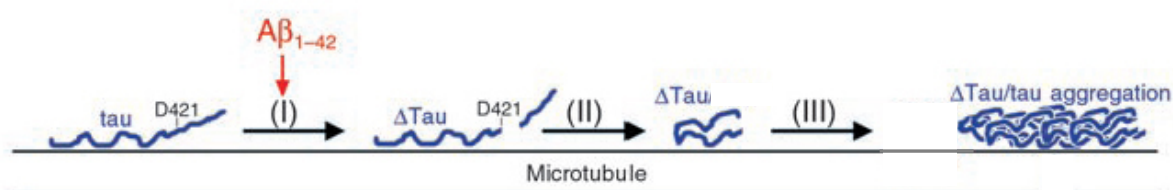


Figure 22 : Modèle proposé pour la formation des DNF (d'après Rissman et al, 2004).

Ces résultats suggèrent que le clivage de tau par les caspases pourrait être un important élément en aval de la cascade des événements provoqués par A $\beta$ .

En outre, Park et Ferreira (2005) ont montré, dans des cultures de neurones hippocampiques, que le peptide A $\beta$  génère, par l'activation de calpaïnes, un fragment tau de 17 kDa toxique menant à la dégénérescence des neurones et à leur mort.

Tau pourrait médier la neurotoxicité A $\beta$  par la génération protéolytique des filaments et des fragments toxiques de tau. La régulation négative des protéines tau pourrait constituer un mécanisme de neuroprotection à l'origine des fonctions cognitives observées dans les modèles d'animaux de tauopathie.

De nombreux travaux se sont concentrés sur la phosphorylation et le clivage de la protéine tau mais il est aussi important d'étudier l'expression de tau et de chercher à déterminer si la modulation de son expression pourrait avoir un effet neuroprotecteur sur la cellule.

### **III- Relations entre l'expression de tau et la mort neuronale**

De nombreuses études se sont intéressées à l'analyse de l'expression du gène de tau. Goedert et collaborateurs en 1989a, ont montré que les six isoformes de tau se trouvent en quantité égale chez les patients alzheimeriens et chez les témoins. Esclaire et collaborateurs, en 1997, ont tout d'abord montré qu'une exposition de neurones corticaux en culture à un stress excitotoxique (glutamate) provoque une augmentation de l'expression génique neuronale de la protéine tau. Or de nombreuses études démontrent que la mort neuronale engendrée par un stress excitotoxique survient en partie par apoptose (Bonfoco et al, 1995 ; Lesort et al, 1997). Puis, Esclaire et collaborateurs, en 1998, ont démontré que les neurones apoptotiques présentent une importante diminution du niveau d'expression génique de tau bien qu'elle ne semble pas spécifique de la protéine tau car ils observent une chute similaire des ARNm de l'actine- $\beta$ . Ils ont également observé une diminution non spécifique de l'ARNm de tau après exposition des cultures neuronales au peptide  $\beta$ -amyloïde 25-35 car les ARNm de l'actine- $\beta$  diminuent également.

Puis, de nombreuses études ont essayé d'évaluer les niveaux relatifs des ARNm tau3R et tau4R dans la MA, mais des résultats contradictoires ont été obtenus. Par exemple, une étude a montré une augmentation des ARNm tau4R dans la MA (Yasojima et al, 1999), mais d'autres études ont montré qu'il n'y avait aucun changement de quantité des différentes isoformes (Chambers et al, 1999 ; Boutajangout et al, 2004 ; Umeda et al, 2004). En utilisant des anticorps reconnaissant les isoformes tau 3R et tau 4R, de Silva et collaborateurs (2003) ont trouvé que l'isoforme tau 3R semblait exprimée de façon prépondérante dans les agrégats de la MA. Puis, Hyman et collaborateurs, en 2005, ont étudié si l'expression de l'ARNm de tau était augmentée dans la MA par la méthode de PCR quantitative en mesurant les niveaux d'ARNm de tau 3R. En comparant la quantité d'ARNm de tau 3R détectée dans 12 cerveaux de patients alzheimeriens par rapport à celle trouvée dans 16 cerveaux de patients témoins, ils ont trouvé une diminution des niveaux d'ARNm dans les cerveaux alzheimeriens. Cependant, il est possible que cela reflète une diminution générale des neurones, connue pour apparaître au cours de la MA. En effet, la normalisation des niveaux de tau par rapport à GADPH (gène ubiquitaire) ne révèle pas de différence statistiquement significative entre les cerveaux alzheimeriens et témoins (Hyman et al, 2005).

Par ailleurs, après la création des premières souris transgéniques surexprimant la protéine tau humaine en 1995 (Götz et al 1995) il s'est avéré que la modulation de l'expression de tau pouvait avoir un rôle dans l'apparition d'une axonopathie et dans la redistribution somatodendritique de la protéine tau. Puis, avec l'identification en 1998 des mutations de tau dans la FTDP-17, plusieurs groupes ont réussi à obtenir des DNF, à la fois dans les neurones (Lewis et al, 2000) et dans les cellules gliales des souris transgéniques surexprimant des mutants de la protéine tau (Higuchi et al, 2002 ; Kins et al, 2003).

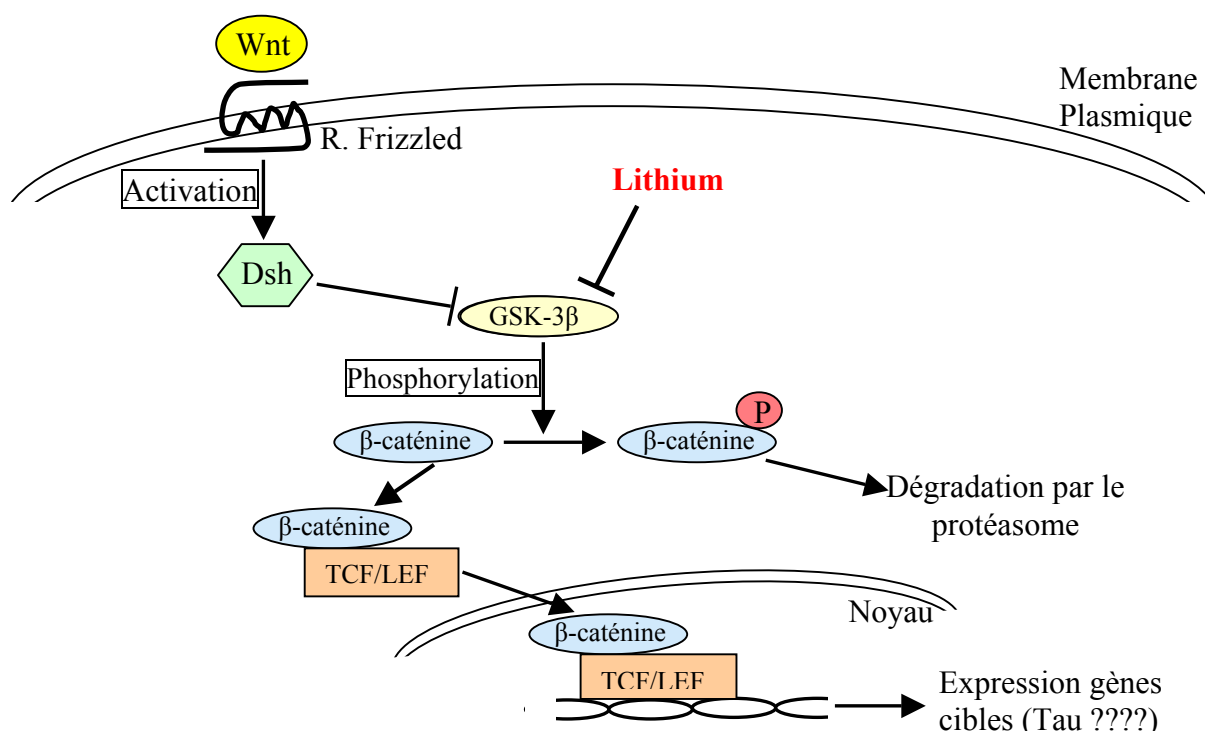
Dans la MA et d'autres tauopathies, tau hyperphosphorylée n'est plus associée aux microtubules et forme des agrégats appelés DNF. Il semble que l'accumulation de tau sous la forme de PHF, constituant les DNF, pourrait représenter un gain de fonction négatif (King, 2005) et provoquerait la neurodégénérescence neurofibrillaire. Ainsi, les DNF seraient corrélées avec les déficits cognitifs (Arriagada et al, 1992 ; Bancher et al, 1993 ; Guillozet et al, 2003) et la perte neuronale (Gomez-Isla et al, 1997 ; Oddo et al, 2004 ; Bennett et al, 2004) dans la MA et d'autres tauopathies (Spillantini et Goedert, 1998).

En accord avec ces données, des expériences sur les souris transgéniques exprimant des variants de la protéine tau humaine de la FTDP-17 ont montré que des déficits neurologiques et des pertes neuronales apparaissent avec des DNF (Tatebayashi et al, 2002 ; Andorfer et al, 2003). Ainsi, l'association entre les DNF, la perte neuronale, et le dysfonctionnement du cerveau chez les hommes et les souris a mené à émettre l'hypothèse que les DNF provoquent invariablement des dysfonctionnements du cerveau et la neurodégénérescence. A l'opposé, Santa Cruz et collaborateurs (2005) ont montré récemment que les DNF ne sont pas suffisantes pour causer le déclin cognitif ou la mort neuronale dans leur modèle de souris tauopathique. En effet, les souris exprimant un variant répressible humain mutant de tau développent une DNF progressive liée à l'âge, une perte neuronale, et une détérioration de la mémoire. Après la suppression de tau, la fonction de mémoire est recouvrée et le nombre de neurones est stabilisé, mais les DNF ont continué à s'accumuler.

En outre, des études réalisées par Rapoport et collaborateurs (2002) ont montré que les neurones exprimant soit la protéine tau de souris soit la protéine tau humaine, dégèrent en présence de peptides A $\beta$  pré-agrégés tandis que les neurones déplétés en tau étaient résistants à la toxicité A $\beta$ .

Par ailleurs, deux études récentes ont clairement démontré qu'un traitement chronique avec du lithium, inhibant la GSK-3 $\beta$ , réduit les lésions tau et la neurodégénérescence chez les souris transgéniques surexprimant les variants humains de tau mutants (Noble et al, 2005; Nakashima et al, 2005). Cette réduction serait due à un changement de l'état de phosphorylation de tau. Cependant, il faut savoir que le mécanisme thérapeutique d'action du lithium n'est pas encore clair, puisqu'un grand nombre d'effets biochimiques lui sont attribués (Jope, 1999) et par conséquent il pourrait également jouer d'autres rôles que celui de modifier l'état de phosphorylation de tau par l'intermédiaire de GSK-3 $\beta$ . La capacité de neuroprotection du lithium a conduit de nombreuses équipes à suggérer la possibilité que l'utilisation thérapeutique du lithium déjà employé pour le traitement des troubles de l'humeur pourrait être étendu aux troubles neurodégénératifs où le lithium pourrait être capable de retarder la mort neuronale (Grimes et Jope, 2001 ; Tong et al, 2001 ; Li et al, 2000b ; Li et al, 2002). La cible moléculaire du lithium la plus étudiée est la GSK-3 $\beta$ . Cette protéine kinase est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire (Frame et Cohen, 2001) et a été

identifiée comme un régulateur clé du destin cellulaire du neurone (Hetman et al, 2000 ; Cross et al, 2001 ; Facci et al, 2003). GSK-3 $\beta$  participe aussi à de nombreuses cascades de signalisation, incluant la voie phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Pap et Cooper, 1998) et la voie canonique de wingless (Wnt) (Dale, 1998). Dans cette voie (Figure 23), la présence d'un ligand Wnt extracellulaire, se fixant sur un récepteur de la famille « Frizzled » ancré à la membrane, assurant la transmission du signal à l'espace intracellulaire, active la protéine « Dishelvelled » (Dsh). Cette protéine Dsh inactive GSK-3 $\beta$  en formant un complexe multiprotéique. Cette inactivation de GSK-3 $\beta$  se traduit par une augmentation du niveau intracellulaire de la  $\beta$ -caténine. Cette dernière va alors se lier au TCF (T-Cell Factor) et au LEF (Lymphoid Enhancer-binding Factor). Le complexe  $\beta$ -caténine-TCF/LEF va se transloquer vers le noyau et activer la transcription des gènes cibles de Wnt. A l'opposé, en absence du ligand Wnt, GSK-3 $\beta$  est activée et peut ainsi phosphoryler la  $\beta$ -caténine qui est alors ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. Le niveau de  $\beta$ -caténine dans le cytosol diminue et l'expression des gènes n'est pas induite (Orford et al, 1997). Ainsi, en inhibant GSK-3 $\beta$ , le lithium stabilise la  $\beta$ -caténine et de ce fait, le lithium mime la voie de signalisation Wnt.



**Figure 23 : Régulation de la transcription des gènes par la voie de signalisation Wnt et par le lithium (d'après Lenox et Wang, 2003).**

Suite à l'inhibition de GSK-3 $\beta$  par le lithium, la  $\beta$ -caténine va se transloquer dans le noyau et moduler ainsi l'expression de nombreux gènes (Lenox et Wang, 2003). Nous pouvons donc nous demander si le gène tau fait partie de ces nombreux gènes régulés par la  $\beta$ -caténine ?



## **MATERIEL ET METHODES**

Tous les produits ou réactifs sans précision de leur provenance sont achetés chez le fournisseur Sigma.

## **I- Culture primaire de neurones corticaux**

Les cortex cérébraux sont prélevés sur des fœtus de rates Wistar, âgés de 17 jours. La dissection des cortex cérébraux s'effectue dans du tampon phosphate salin (PBS, GibcoBRL) supplémenté en glucose et en antibiotiques. Les méninges, le striatum ainsi que l'hippocampe sont éliminés. Les cortex ainsi isolés sont ensuite dissociés mécaniquement dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium, Eurobio) par passages itératifs dans une pipette Pasteur. La suspension cellulaire obtenue est ensuite centrifugée 12 minutes à 1500 tours/minute. Le surnageant est alors éliminé tandis que le culot cellulaire est remis en suspension dans un mélange de 50% de MEM et 50% de B27/Neurobasal (Invitrogen), supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio), 2 mM de L-glutamine (Eurobio) et des antibiotiques (50 UI.mL<sup>-1</sup> de Pénicilline et 50 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine).

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture stériles de 35 mm de diamètre ou des plaques de 24 puits comportant une lamelle de verre de 14 mm de diamètre au fond de chaque puits ou des plaques de 96 puits. Les boîtes et plaques de culture sont précoatées avec une solution de poly-L-lysine à 5 µg.mL<sup>-1</sup> pendant au moins deux heures à 37°C. Puis les boîtes et les puits sont rincés au PBS etensemencés à la densité de 2.10<sup>6</sup> cellules par boîtes et de 13,5.10<sup>6</sup> cellules par plaque. Les cellules sont maintenues pendant 7 jours à 37°C dans une étuve régulée à 5% de CO<sub>2</sub> et à saturation en eau. Après 4 jours de culture, le milieu de culture est remplacé par du MEM contenant 5 µM d'un mélange de 5-fluoro-2'-désoxyuridine et d'uridine (dfu) afin de limiter la prolifération des cellules mitotiques non neuronales (cellules gliales et macrophages).

Après 7 à 8 jours de culture, les cellules sont traitées ou non par des molécules ajoutées dans le milieu de conditionnement de ces cellules.

## II- Traitements des cultures

Dans les différentes expérimentations réalisées, tous les traitements ont été réalisés après 7 à 8 jours de culture *in vitro* de neurones corticaux de rat. Les différentes molécules utilisées sont :

### - un inhibiteur des caspases :

Boc-D-FMK (t-butoxycarbonyl-Asp(OMe)-fluoromethyl-ketone) est un inhibiteur à large spectre des caspases, qui diffuse à travers les membranes (Enzyme Systems Products). Il a été utilisé à des concentrations de 50 et 100  $\mu\text{M}$  en présence ou non de staurosporine ou de lithium.

### - un inhibiteur des calpaïnes :

ALLN (N-acétyl-Leu-Leu-Nle-CHO) est un inhibiteur des calpaïnes, diffusible à travers les membranes (Calbiochem). Il a été utilisé à une concentration de 2,5 et 5  $\mu\text{M}$  en présence ou non de staurosporine ou de lithium.

### - un inhibiteur du protéasome :

MG132 (N-LBZ-Leu-Leu-Leu-Al) est un inhibiteur du protéasome, diffusible à travers les membranes (Calbiochem). Il réduit ainsi la dégradation des protéines conjuguées à l'ubiquitine. Il a été utilisé à une concentration de 1 ; 2,5 et 5  $\mu\text{M}$  en présence ou non de lithium.

### - l'acide okadaïque :

L'acide okadaïque (OKA) est un polyéther d'acide gras qui inhibe les protéines phosphatases PP1, PP-2A et PP-2C. Il a été utilisé à des concentrations de 25 et 50 nM en présence ou non de colchicine.

### - la staurosporine :

La staurosporine est un inhibiteur à large spectre des protéines kinases, notamment la PKC. Elle est connue pour induire l'apoptose (Boix et al, 1997). Une solution mère de 1 mM dans

du diméthylsulfoxyde (DMSO) a été préparée. Les cultures (4 boîtes par condition, à savoir : 2 boîtes fixées pour les études d'immunocytochimie et 2 boîtes utilisées pour les études par la technique du western blot) sont traitées par 0,5  $\mu\text{M}$  de staurosporine pendant différents temps (15, 30 et 45 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16 et 24 h). Puis uniquement pendant 8 h avec 0,5  $\mu\text{M}$  de staurosporine et/ou en présence d'inhibiteur des caspases Boc-D-FMK (à 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$ ) ou d'inhibiteur des calpaïnes (5  $\mu\text{M}$ ). Les cellules contrôles sont traitées par du milieu de conditionnement contenant du DMSO avec la même concentration que celle se trouvant dans la staurosporine.

#### **- la colchicine :**

Cette molécule est une drogue qui va inhiber la formation du fuseau mitotique en se liant à la tubuline, elle dépolymérise les microtubules et bloque les cellules en métaphase. Deux traitements ont été réalisés, avec pour chaque condition de traitement 2 boîtes de culture utilisées. Les cellules sont d'abord mises en présence de colchicine à concentration constante (1  $\mu\text{M}$ ) pendant différents temps (1h, 2h, 4h, 6h, 8h et 12h). Puis uniquement pendant 8h avec la même concentration de colchicine et/ou en présence d'acide okadaïque (à 25 nM et 50 nM) ou d'inhibiteur des caspases Boc-D-FMK (à 100  $\mu\text{M}$ ). Les cellules contrôles sont traitées par du milieu de conditionnement contenant du DMSO avec la même concentration que celle se trouvant dans la colchicine.

#### **- le chlorure de lithium :**

Le lithium est un médicament utilisé pour traiter les troubles bipolaires (il régule les troubles de l'humeur). C'est également un inhibiteur de la glycogène synthétase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Nous utiliserons une solution mère de chlorure de lithium (LiCl) à 1 M préparée dans de l'eau distillée puis diluée dans le milieu de culture pour obtenir les concentrations finales voulues (1,25 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mM). Le terme de « lithium » sera utilisé pour désigner le chlorure de lithium tout au long du manuscrit.

#### **- le peptide $\beta$ -amyloïde :**

Le peptide synthétique A $\beta$  (1-40) a été dissout dans du MEM à une concentration de 0,5 mg/ml et afin de le pré-agrégé il a été incubé pendant 4 jours à 37°C. Les cultures ont ensuite été pré-incubées avec 2,5 mM de lithium pendant 8h. Puis, elles ont été rincées avec du MEM et traitées avec 20  $\mu\text{M}$  de peptide A $\beta$  pré-agrégé pendant 24 h.

### **III- Etude de la toxicité par le test au MTT**

Le test au MTT (Mosmann, 1983) est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables. Il est basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) de couleur jaune en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés dans du DMSO et sont ainsi détectables par spectrométrie à une longueur d'onde de 570 nm. Les densités optiques obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes.

Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits selon une densité de 240 000 cellules par plaque pendant 24 h avant d'être traitées. Pour chaque condition analysée, 8 puits différents sont réalisés (n = 8). Après 7 jours de mise en culture, le traitement des cellules est réalisé pendant 8 heures puis, 25 µL de MTT à 2 mg/mL sont ajoutés dans chaque puits. Après 1 heure à 37 °C, le milieu est éliminé avant d'ajouter 50 µL de DMSO par puits. Au bout de 30 minutes, la lecture des densités optiques est réalisée avec le lecteur de plaque ELISA (Dynex, Technologies, MRX) à 570 nm.

Les résultats sont présentés en pourcentage de contrôles :

$(DO_{\text{moyenne}} \text{ des cellules traitées} / DO_{\text{moyenne}} \text{ des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$

### **IV- Analyse protéique par western blot et immunocytochimie**

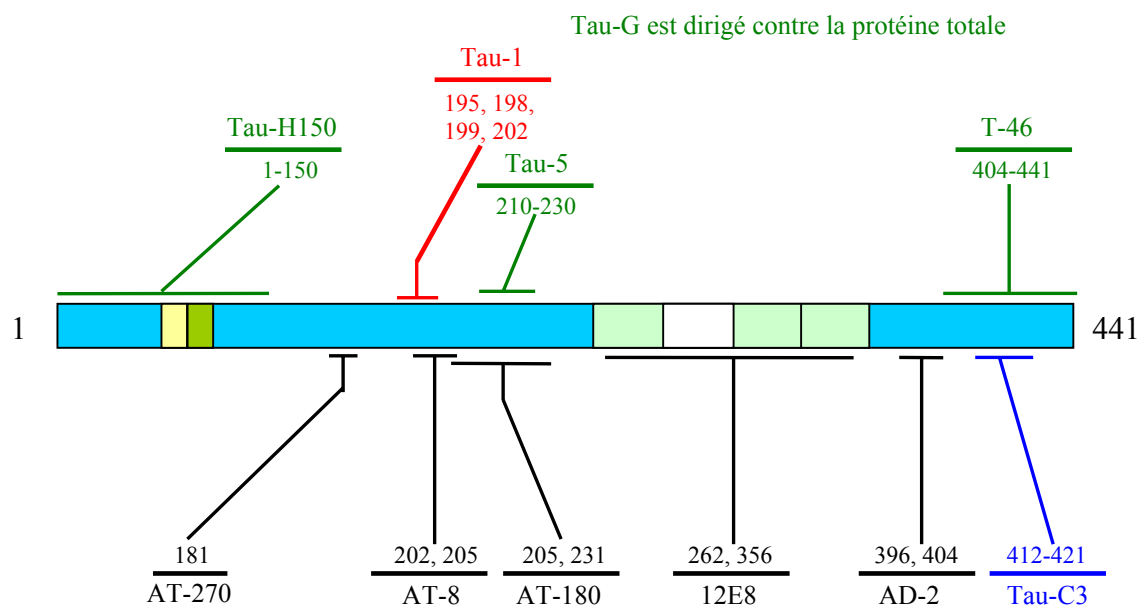
#### ***1- Anticorps utilisés***

De nombreux anticorps primaires reconnaissant la protéine tau selon son état de phosphorylation, indépendamment de son état de phosphorylation, ou encore certains fragments de la protéine tau ont été utilisés. Puis, les anticorps secondaires couplés à la peroxydase dilués au 1/5000 correspondant aux anticorps primaires ont été utilisés. Les conditions d'utilisation sont résumées dans le tableau suivant :

<b>Anticorps primaires</b>	<b>Sites</b>	<b>Dilutions</b>	<b>Anticorps secondaires (DAKO)</b>
<b>Anticorps anti-tau phospho-dépendants</b>			
AT-8 (Chemicon)	Ser202 et Thr205	1/2000	Chèvre anti IgG de souris
AT-180 (Chemicon)	Thr231 et Thr205	1/1000	Chèvre anti IgG de souris
AT-270 (Chemicon)	Thr181	1/2000	Chèvre anti IgG de souris
12E8 (Dr Seubert, San Francisco)	Ser-262 et Ser-356	1/2500	Chèvre anti IgG de souris
AD-2 (Dr Mourton-Gilles, Montpellier)	Ser-396 et Ser-404	1/2500	Chèvre anti IgG de souris
Tau-1 (Chemicon)	Sérines 195, 198, 199 et 202	1/2500	Chèvre anti IgG de souris
<b>Anticorps anti-tau phospho-indépendants</b>			
Tau-5 (Calbiochem)	Résidus 210-230	1/2500	Chèvre anti IgG de souris
T-46 (Dr Lee, Pennsylvania)	Résidus 404-441	1/2000	Chèvre anti IgG de souris
Tau-H150 (Tebu-bio)	Résidus 1-150	1/1000	Chèvre anti IgG de lapin
Tau-G (Sigma)	Dirigé contre la molécule entière de tau	1/1000	Chèvre anti IgG de lapin
<b>Anticorps anti-tau clivée</b>			
Tau-C3 (Prof Binder, Chicago)	Résidus 412-421	1/1000	Chèvre anti IgG de souris
<b>Anticorps anti-caspase-3 clivée</b>			
Anti-caspase-3-cleaved (Cell Signalling)	Dirigé contre un fragment de 17-19 kDa de la caspase-3 activée	1/1000	Chèvre anti IgG de lapin
<b>Anticorps contrôles</b>			
Anti- $\beta$ -caténine (Tebu-bio)		1/1000	Chèvre anti IgG de lapin
Anti- $\beta$ -actine (Sigma)		1/2000	Chèvre anti IgG de souris
Anti-GADPH (Tebu-bio)		1/1000	Chèvre anti IgG de lapin

**Tableau 1 : Anticorps utilisés pour l'immunodétection en western blot.**

Nous pouvons visualiser sur la protéine tau les différents sites de reconnaissance des anticorps anti-tau sur la figure suivante :



**Figure 24 : Sites de fixation des divers anticorps sur la protéine tau.** Anticorps anti-tau phosphorylée (noir), anticorps anti-tau déphosphorylée (rouge), anticorps anti-tau clivée (bleu) et anticorps anti-tau phospho-indépendants (vert).

## 2- Western blotting

### 2-1 Extraction des protéines totales

Après traitement, les extraits cellulaires sont récupérés par lyse dans un tampon de Laemmli modifié (250  $\mu$ L par boîte de 35 mm, deux boîtes ont été utilisées par condition). Ce tampon est composé du tampon de Laemmli classique : 2% de SDS, 10% de glycérol, 60 mM de Tris-HCl (pH 6,8) supplémenté avec 0,5 mM de sodium orthovanadate (NaVO<sub>3</sub>), 2,5  $\mu$ g/ml de N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 2,5  $\mu$ g/ml de N $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), 0,5 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA, 1  $\mu$ M de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 400  $\mu$ l de cocktail d'inhibiteur de protéase, 400  $\mu$ l de cocktail d'inhibiteur de phosphatase et 1  $\mu$ M d'acide okadaïque (OKA), pH 6,8 pour un volume final de 20 ml. Puis, les extraits sont soniqués. Ensuite, les extraits sont centrifugés 13000 tours/minute (rpm), 15 min à 4°C et placés dans la glace ou à -20°C avant de déterminer la concentration protéique par dosage protéique. Les échantillons sont dénaturés

en les plaçant à 95°C sur une plaque chauffante pendant 5 minutes. Du dithiothréitol (DTT) à 50 mM, 0,5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0,01% de bleu de bromophénol sont ajoutés.

### ***2-2 Fractionnement des formes soluble et liée de tau***

Ce tampon a été utilisé pour extraire les protéines et séparer les fractions soluble et liée aux microtubules de la protéine tau. Les cellules ont donc été rincées avec un « tampon de fractionnement » composé de 80 mM de Pipes (pH 6,8), 1 mM de  $MgCl_2$ , 2 mM d'EGTA, 30% de glycérol, 10 mM de benzamidine, 50  $\mu g/ml$  de leupeptine, 1 mM de PMSF, 400  $\mu l$  de cocktail d'inhibiteur de protéase, 400  $\mu l$  de cocktail d'inhibiteur de phosphatase et 0,5  $\mu M$  d'acide okadaïque pour un volume final de 20 ml. Puis, les cellules sont incubées dans 250  $\mu l$  de « tampon de fractionnement » par boîte de culture contenant en plus 0,1% de Triton X-100 pendant 10 min à 37°C. Puis les extraits sont centrifugés pendant 2 min à 16000g. Les surnageants sont mélangés (V/V) avec du tampon de Laemmli modifié et dénaturés en les plaçant à 95°C sur une plaque chauffante pendant 5 minutes. Les culots sont resuspendus dans 100  $\mu L$  de tampon stop 2X (500 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 10% de SDS, 100 mM d'EGTA, 100 mM d'EDTA et 10% de glycérol), soniqués puis mélangés (V/V) avec du tampon de Laemmli modifié et dénaturés en les plaçant à 95°C sur une plaque chauffante pendant 5 minutes.

Afin de déterminer si un clivage de tau apparaît au cours du fractionnement dans les fractions soluble et liée de tau, le fractionnement est effectué après maintien des cellules pendant 10 ou 20 min dans le « tampon de fractionnement » à 37°C avec ou sans inhibiteur des caspases (Boc-D-FMK).

### ***2-3 Dosage protéique***

La détermination de la concentration en protéines des échantillons se fait par un dosage colorimétrique (DC Protein Assay Biorad) selon une réaction similaire à celle de la méthode de Lowry. Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur la résultante de deux réactions colorées simultanées : une réaction de type Biuret, par laquelle les molécules polypeptidiques qui contiennent au moins quatre groupements (-CO-NH-) donnent en milieu



alcalin un complexe cuivrique coloré, et une réaction par laquelle les noyaux phénoliques de la tyrosine et du tryptophane et à un degré moindre la cystéine et l'histidine, réduisent le réactif de Folin (tungsto-phosphomolybdique). Les intensités de coloration développées sont proportionnelles à la concentration protéique des extraits dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie.

Une gamme BSA (**bovine serum albumin**) étalon a tout d'abord été réalisée, de 0 g.L<sup>-1</sup> à 1,5 g.L<sup>-1</sup> de protéines, dans du tampon d'extraction Laemmli modifié. Chaque échantillon a été dilué afin de ramener la concentration de SDS à moins de 0,1% (sinon il interférerait avec le dosage) afin que les valeurs mesurées ne soient pas supérieures à celles de la gamme étalon. Les dépôts s'effectuent dans une plaque de 96 puits, dans lesquels 5 µL d'échantillon ont été ajoutés, ainsi que 25 µL du mélange réactif A/réactif S et 200 µL de réactif B. Pour chaque échantillon, 4 dépôts ont été effectués et analysés afin de réaliser une moyenne des valeurs obtenues.

Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les absorbances de chaque puits sont lues par un lecteur de microplaque ELISA (Dynex, Technologies, MRX) à 562 nm par rapport à un blanc (réactifs seuls). Une droite de régression a ainsi pu être réalisée par le logiciel *Excel* (Microsoft) à partir des valeurs de DO de la gamme BSA, ce qui a permis de déterminer les concentrations protéiques de chaque échantillon et donc d'en déduire le volume d'échantillon à déposer dans les puits du gel de migration, selon la quantité de protéine que l'on souhaite faire migrer par SDS-PAGE.

## ***2-4 Migration***

La séparation des protéines contenues dans les échantillons est réalisée par migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide SDS avec un gradient 4-20% de polyacrylamide.

Les échantillons dosés et dénaturés sont déposés et la quantité de protéines déposée varie de 6,25 µg à 50 µg selon l'anticorps primaire qui sera utilisé dans les étapes suivantes (Tableau 1). La même quantité de protéines est déposée dans les pistes d'un même gel.

La migration s'effectue dans du tampon de migration pH 8,3 (3,03 g de TrizmaBase – 14,42 g de glycine – 1 g de SDS – ED qsp 1L) à 200 V et à 4°C pendant 1 heure.

## 2-5 *Transfert*

Après migration, les gels sont équilibrés dans du tampon de transfert pH 9,2 (5,82 g de TrizmaBase – 2,93 g de glycine – 20% de méthanol - ED qsp 1L) pendant 20 à 30 minutes sous agitation. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF, Immobilon, 0,45 µm, Millipore) préalablement régénérée dans du méthanol. Le transfert s'effectue sur l'appareil de transfert (Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) où la membrane est déposée sur du papier Wattman et recouverte par le gel, lui-même recouvert de papier Wattman. Le transfert s'effectue dans du tampon de transfert à 17 V pendant 1 heure.

Après le transfert, les membranes sont colorées au rouge S-Ponceau afin de vérifier que la migration et le transfert des protéines sont corrects, puis rincées dans un tampon Tris Buffer Saline (TBS) pH 7,4.

## 2-6 *Immunoblots*

Les sites aspécifiques sont saturés pendant 30 minutes par 4% de lait écrémé dans du TBS à température ambiante sous légère agitation. Après rinçage au TBS, les membranes sont incubées en présence de différents anticorps reconnaissant la protéine tau indépendamment de son état de phosphorylation, phosphorylée, déphosphorylée, ou encore reconnaissant certains fragments de la protéine tau (voir Tableau 1). L'incubation est effectuée pendant une nuit à 4°C.

Les membranes sont ensuite rincées au TBS pour éliminer l'excès d'anticorps primaire, puis incubées pendant au moins 45 minutes avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la peroxydase (Tableau 1) dilué au 1/5000.

Après 3 nouveaux rinçages de 10 minutes au TBS, la révélation s'effectue en chambre noire à l'aide du kit *ECL Plus* (Amersham Biosciences) et fait intervenir des réactifs photosensibles : le kit permet de réaliser une réaction basée sur l'oxydation d'une molécule substrat de la peroxydase, le diacylhydrazide luminol cyclique. Un ester d'acridinium est alors formé et produit une lumière intense de façon durable.

La membrane est mise en présence du réactif *ECL* du kit et recouverte de film *Saran*, puis mise au contact d'un film radiographique *KODAK* dans une cassette d'exposition (Hypercassette™, Amersham Biosciences) de 30 secondes à 15 minutes selon l'intensité de la

réaction. Les films sont ensuite révélés, fixés et séchés avant d'être scannés et exploités par le logiciel *Adobe Photoshop*.

Il est également possible de déshybrider les anticorps de la membrane lorsque nous voulons utiliser un autre anticorps sur la même membrane. Pour ce faire, après avoir ôté le film *Saran*, les membranes sont rincées au TBS. Elles sont ensuite installées dans un tube, puis immergées dans 5 mL de tampon de déshybridation (756,9 g de TrizmaBase – 699  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoéthanol – 2% de SDS - ED qsp 100 mL, pH 6,7), et placées sous agitation rotative à 50°C pendant 30 minutes. Puis les membranes sont rincées abondamment au TBS et immergées dans du TBS à 4% de lait pendant une heure. Les étapes de l'immunodétection sont alors répétées en utilisant un autre anticorps primaire.

### ***3- Immunocytochimie***

Les cultures sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde dans du PBS pendant 20 min à température ambiante. Une étape supplémentaire de post-fixation par le méthanol absolu pendant 7 min à -20°C est nécessaire afin d'augmenter l'immunomarquage. Puis les cellules sont rincées au TBS pH 7,4 trois fois pendant 5 min. Des triples marquages ont été réalisés pour lesquels les étapes suivantes sont identiques pour tous les anticorps utilisés :

- Les cellules fixées sont incubées en présence de deux anticorps primaires pendant 2 h et rincées 3 fois 5 min avec du TBS pH 7,4.
- Puis, les cellules sont incubées simultanément pendant 45 min avec deux anticorps secondaires adéquats, l'un couplé à la FITC (fluorescence verte) et l'autre couplé à la TRITC (fluorescence rouge) et rincées 3 fois 5 min avec du TBS pH 7,4.
- Les noyaux des cellules sont ensuite marqués par le DAPI (1  $\mu$ g/ml dans du TBS pH 7,4) pendant 1 min puis rincés 3 fois 5 min avec du TBS pH 7,4.
- Les boîtes de culture ou lamelles sur lesquelles sont fixées les cellules sont montées dans du Mowiol (4,7 ml de glycérol - 2,4 g de Mowiol - 0,2 M de Tris - ED qsp 20 mL, pH 8,5).
- Enfin, l'observation des immunomarquages est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 800 E) en utilisant les filtres appropriés. L'acquisition des images est effectuée par l'utilisation du logiciel *Visiol@b 2000* (Biocom France).

Différentes combinaisons de triples marquages ont été réalisées et sont résumées dans le tableau suivant :

Anticorps primaires	Dilution	Anticorps secondaires	Dilution	Marquage nucléaire
<b>1<sup>ère</sup> combinaison</b>				
AT-8, IgG1 $\kappa$ (Chemicon)	1/200	anti-IgG1 couplé à la TRITC (Jackson Laboratories USA)	1/1000	DAPI
Tau-1, IgG2a (Chemicon)	1/500	anti-IgG2a couplé à la FITC (Jackson Laboratories USA)	1/1000	
<b>2<sup>ème</sup> combinaison</b>				
Tau-G (Sigma)	1/50	anti-IgG de lapin couplé à la TRITC (Jackson Laboratories USA)	1/1000	DAPI
Tau-1, IgG2a (Chemicon)	1/500	anti-IgG2a couplé à la FITC (Jackson Laboratories USA)	1/1000	
<b>3<sup>ème</sup> combinaison</b>				
Tau-C3, IgG1 (Prof Binder, Chicago)	1/100	anti-IgG1 couplé à la TRITC (Jackson Laboratories USA)	1/1000	DAPI
Tau-1, IgG2a (Chemicon)	1/500	anti-IgG2a couplé à la FITC (Jackson Laboratories USA)	1/1000	

Tableau 2 : Anticorps utilisés pour l'immunomarquage en immunocytochimie.

## **V- Analyse quantitative de l'apoptose par la détection de la fragmentation de l'ADN génomique *in situ***

### ***1- Marquage nucléaire au DAPI***

La mise en évidence morphologique de l'apoptose est réalisée par un marquage de l'ADN nucléaire qui est condensé puis fragmenté au cours de l'apoptose.

Les cultures ont été fixées par du paraformaldéhyde (4% dans du PBS, pendant 20 minutes) et marquées par le DAPI (1 µg/ml dans du PBS pendant 2 minutes). Cette sonde se fixe spécifiquement sur l'ADN nucléaire.

Les boîtes de cultures sont ensuite montées dans du Mowiol et analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence en utilisant les filtres appropriés (filtre DAPI, fluorescence bleue). L'acquisition des images se fait à l'aide du logiciel *Visiolab 2000* (Biocom France). Les noyaux condensés ou fragmentés ont été considérés comme étant apoptotiques.

## ***2- Technique du TUNEL***

La technique du TUNEL ("TdT-mediated dUTP nick end labeling") est réalisée avec un kit pour "détection et quantification de l'apoptose au niveau cellulaire" (Boehringer Mannheim). Les cellules entrant en apoptose présentent des modifications caractéristiques au niveau du noyau. L'endonucléolyse est considérée comme un marqueur biochimique clé de l'apoptose. Elle entraîne un clivage de l'ADN nucléaire en fragments d'oligonucléosomes. La détection de la fragmentation de l'ADN est réalisée par marquage enzymatique *in situ* sur des cultures fixées. La TdT accroche des résidus d'UTP conjugués à la FITC aux extrémités 3'OH libres de l'ADN fragmenté. Le marquage de la fragmentation peut être visualisé au microscope à épifluorescence. La sensibilité du marquage peut être amplifiée par un anticorps dirigé contre la FITC et couplé à la peroxydase.

## **VI- Dosage de l'activité de la caspase-3**

Le dosage de l'activité caspase-3 se fait à partir du kit « CaspACE™ Assay System, Fluorometric » (Promega). Le dosage est basé sur l'activité protéolytique des caspases. En effet, la caspase-3 clive son substrat après un motif bien précis : DEVD. Le substrat utilisé pour réaliser ce dosage est rendu lipophile grâce à un groupement acétyl et est couplé à un fluorochrome, le 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC), qui est libéré lorsque le substrat est clivé par la caspase. Une fois libéré, l'AMC émet de la fluorescence permettant de quantifier l'activité de chaque caspase.

Les cellules sont cultivées pendant 7 jours, puis traitées par 1,25 à 7,5 mM de lithium pendant 8 h. Les cellules sont récupérées et lysées dans du tampon de lyse hypotonique (25 mM d'HEPES (pH 7,5), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM d'EDTA, 5 mM de DTT, 2 mM de

PMSF, 10 µg/ml de Pepstatin A et 10 µg/ml de Leupeptin). La concentration des protéines est déterminée par dosage protéique (voir paragraphe IV-2-2). Les essais sont réalisés en plaque de 96 puits opaques (Falcon, Becton Dickinson). 32 µl de tampon caspase (10 mM de DTT, 2 % de DMSO) et 75 µg de protéines sont déposés dans les puits. L'inhibiteur non spécifique de caspase, DEVD-CHO, est utilisé à une concentration de 2,5 mM pour vérifier que le clivage du substrat est bien dû aux caspases et non à une autre protéine ayant un pouvoir protéolytique. La plaque est incubée 30 min à 37°C avant de rajouter le substrat de la caspase-3 (2,5 mM). La fluorescence du bruit de fond est déterminée dans les puits contenant seulement le tampon caspase et le substrat. La plaque est de nouveau incubée à 37°C pendant 1 h. La fluorescence est alors mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Fluorolite 1000, Dynatech Laboratories) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm. Les résultats sont exprimés en pmol d'AMC libérée/min à 30°C/µg de protéines et représentent la moyenne de trois expériences.

## **VII- Analyse de l'expression des ARN**

### ***1- Extraction des ARN totaux***

Les ARN totaux sont extraits des cellules après 7 jours de culture par le lithium (voir mode de culture précédemment décrit).

L'extraction des ARN totaux est réalisée sur les cellules par le réactif TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen) selon une méthode basée sur la technique de Chomczynski et Sacchi (1987). Avant l'extraction, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS1X froid et du DEPC. Les cellules (environ six millions) sont lysées par 1 ml de TRIZOL<sup>®</sup> puis 200 µl de chloroforme sont ajoutés avant que le lysat soit agité vigoureusement, laissé à température ambiante pendant 3 min et centrifugé (12000g, 15 min à 4°C). La phase aqueuse supérieure contenant les ARN est récupérée afin de précipiter ceux-ci par 500 µl d'alcool isopropylique (10 min à température ambiante). Les ARN sont récupérés par centrifugation (12000g, 10 min à 4°C), lavés par de l'éthanol 75%, centrifugés (7500g, 5 min à 4°C), et séchés. Ils sont ensuite repris dans de l'eau ne contenant pas de RNase avant d'être incubés à 60°C pendant 10 min et dosés par spectrophotométrie UV (GeneQuant Pro, Amershampharmacia biotech). La concentration en ARN (µg/ml) est calculée selon la formule :  $DO_{260} \times \text{dilution} \times 40$ . Les ARN sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

## ***2- Transcription inverse***

La transcription inverse ou RT (« reverse transcription ») est réalisée à l'aide du kit « High-Capacity cDNA Archive Kit » (Applied Biosystems) à partir des ARN totaux. Pour chaque échantillon, 10 µl de tampon de transcription reverse 10X, 4 µl du mélange 25X dNTP, 10 µl de random primers 10X, 5 µl de reverse transcriptase multiscribe, sont mélangés à 3 µg d'ARN totaux. Chaque mélange est complété à 100 µl avec de l'eau dépourvue de Rnase avant d'être incubé 10 min à 25°C puis 120 min à 37°C dans le thermocycler (Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2400). Les ADNc ainsi synthétisés sont stockés à -20°C avant utilisation.

## ***3- Réaction de la polymérisation en chaîne quantitative***

La réaction de polymérisation en chaîne quantitative (PCR quantitative) est une technique développée par Saiki et collaborateurs (1985) permettant d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN déterminé. Ici l'amplification se fait sur de l'ADNc et permet donc de détecter le niveau d'expression d'ARNm recherché. La PCR est réalisée à l'aide du kit « TaqMan Universal PCR Master Mix » (Applied Biosystems, USA) à partir de 20 ng d'ADNc de chaque échantillon en mélangeant 10 µl de master mix 2X TaqMan universal et 1 µl de sonde fluorescente TaqMan Mapt (appelée ici tau) ou 1 µl de sonde fluorescente TaqMan GAPDH (contrôle). Le volume du mélange est complété à 20 µl avec de l'eau stérile et les mélanges sont placés dans le thermocycleur (ABI Prism 7000 Sequence Detector System) pour subir les étapes suivantes :

1/ Stérilisation initiale : 2 min à 50°C

2/ Dénaturation : 10 min à 95°C

3/ 40 cycles pendant 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C

4/ Terminaison de la synthèse des néobrans : 10 min à 72°C (1 cycle).

La quantité d'ARNm de tau de chaque échantillon est normalisée par rapport au nombre de copies d'ARNm de GAPDH.

## VIII- Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par des analyses de variances (ANOVA). Toutes les expériences ont été réalisées trois fois minimum. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ . Ces analyses ont été réalisées grâce au logiciel *GraphPad* (San Diego, CA, USA).



# RESULTATS

## Objectifs

Ce travail a pour but d'analyser et de déterminer au cours de l'apoptose neuronale:

- les liens entre la phosphorylation et la déphosphorylation de tau
- les relations entre l'état de phosphorylation et le clivage de tau
- l'implication des enzymes protéolytiques dans le clivage de tau
- les modifications des niveaux de tau après traitement par le lithium et leur impact sur la mort neuronale

# **PARTIE 1 : LIEN ENTRE LES CHANGEMENTS DANS LA PHOSPHORYLATION ET LE CLIVAGE DE TAU DURANT L' APOPTOSE NEURONALE**

Cette première partie a fait l'objet d'une publication (annexe 1):

**Linking alterations in tau phosphorylation and cleavage during neuronal apoptosis.**

Armelle Rametti, Françoise Esclaire, Catherine Yardin, Faraj Terro.

J. Biol. Chem. (2004) vol 279; pp 54518-54528.

Au cours de l'apoptose neuronale, la protéine tau subit des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. Une hyperphosphorylation diminue son affinité pour les microtubules et contribue à une déstabilisation et une réorganisation du cytosquelette. Des données contradictoires ont montré que l'apoptose est associée à une augmentation de la déphosphorylation de la protéine tau. Nous avons alors cherché à **déterminer la séquence d'évènement des changements de phosphorylation de la protéine tau** au cours de l'apoptose neuronale.

La protéine tau subit un clivage protéolytique par des enzymes telles que les caspases et les calpaïnes. Nous avons donc **étudié la relation existant entre ce clivage et les modifications de l'état de phosphorylation de la protéine tau** au cours de l'apoptose neuronale. Nous avons également examiné lors de l'apoptose neuronale, **l'implication de ces enzymes dans le clivage et la dégradation de la protéine tau** ainsi que **la séquence de ces évènements enzymatiques**.

Pour cela nous avons utilisé des cultures primaires de neurones corticaux de rats embryonnaires. L'apoptose a été induite par la staurosporine ou la colchicine et différents agents agissant sur l'état de phosphorylation ou sur le clivage de tau ont été appliqués. Nous avons observé les effets de nos traitements à l'aide de différentes techniques telles que le marquage *in situ* (DAPI, TUNEL, immunocytochimie) et la technique du western blot.

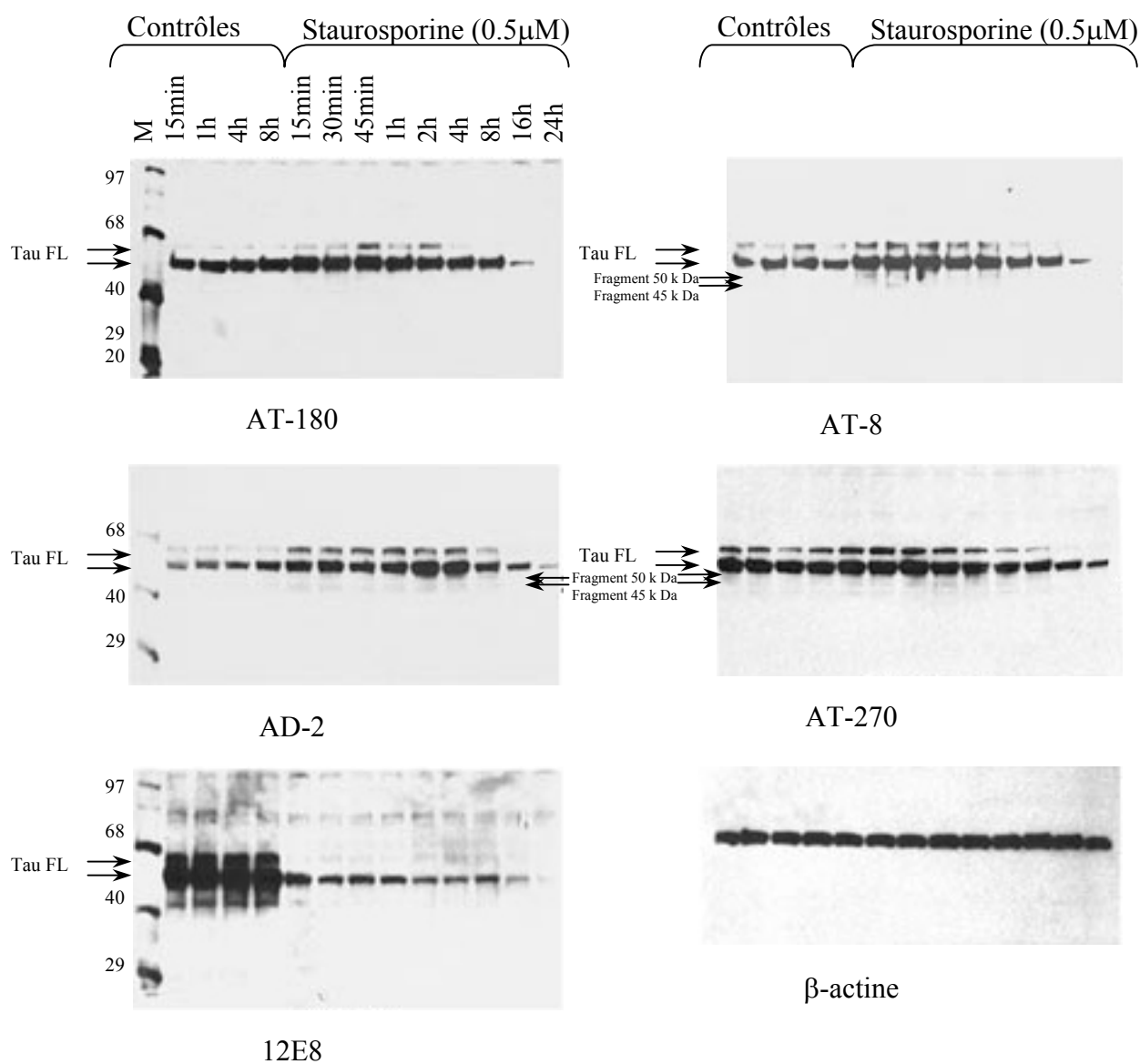
## **I- L'augmentation de la phosphorylation de la protéine tau précède sa déphosphorylation et son clivage au cours de l'apoptose**

Il a largement été admis que la phosphorylation de tau augmente durant l'apoptose neuronale (Davis et Johnson, 1999 ; Zhang et Johnson, 2000). D'un autre côté, les résultats d'études précédentes (Canu et al, 1998 ; Lesort et al, 1997 ; Mills et al, 1998) ont démontré que l'apoptose était associée à l'augmentation de la déphosphorylation de tau. De plus, Canu et collaborateurs ont également montré que la protéine tau subit un clivage protéolytique par des enzymes telles que les caspases et les calpaïnes (Canu et al, 1998 ). Pour comprendre ces données apparemment contradictoires, nous avons analysé les changements de la phosphorylation de tau au cours de l'apoptose neuronale et l'implication de son clivage.

Dans un premier temps, nous avons traité les cultures avec 0,5  $\mu$ M de staurosporine et les avons récoltées dans du tampon de Laemmli modifié à différents temps : 15, 30 et 45 minutes et 1, 2, 4, 8, 16 et 24 heures.

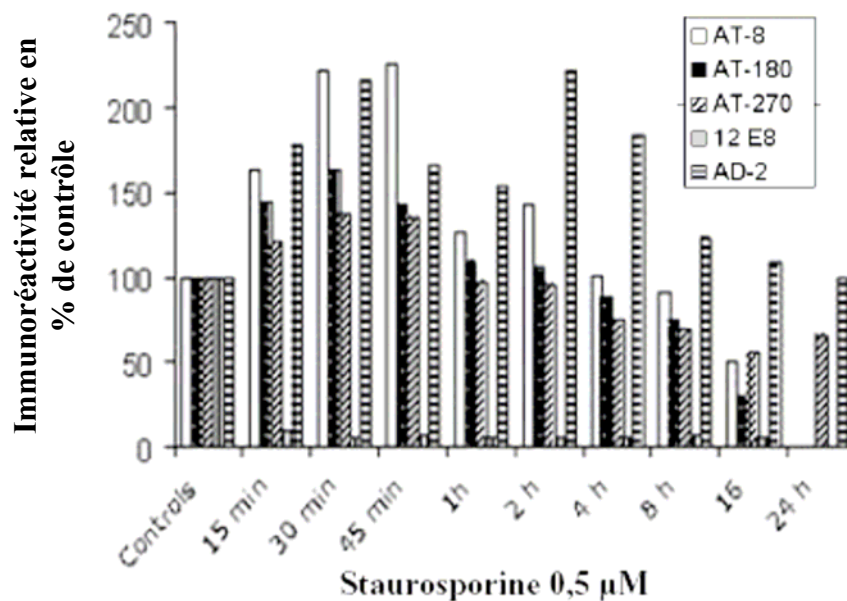
Nous avons analysé les changements de phosphorylation par western blot en utilisant des anticorps anti-tau phospho-dépendants. Un anticorps anti- $\beta$ -actine permet de visualiser l'actine- $\beta$ , protéine ubiquitaire du cytosquelette, et qui servira de protéine contrôle. Dans les contrôles, tous les anticorps anti-tau détectent une bande majeure à 55-56 kDa et une bande mineure à 60-62 kDa. Ces bandes représentent la protéine tau non clivée c'est-à-dire la forme entière (forme entière, full-length = Tau FL) (Figure 25 et Figure 27). Seules les bandes de 55-56 kDa ont été semi quantifiées par densitométrie (Figure 26).

La Figure 25 montre qu'avec les anticorps AT-8, AT-180, AT-270 et AD-2, on a une augmentation transitoire de la phosphorylation de tau au cours du temps. En outre, les changements de la phosphorylation de tau dépendent de l'épitope analysé. En effet, pour les épitopes AT-8, AT-180 et AT-270, l'augmentation de tau phosphorylée apparaît après 15 minutes d'exposition à la staurosporine et culmine après 45 minutes d'exposition alors que pour l'épitope AD-2 ce pic n'apparaît qu'après 2 heures d'exposition.



**Figure 25 : Analyse par western blot de la phosphorylation de la protéine tau en fonction du temps d'exposition à la staurosporine.** Anticorps reconnaissant des épitopes phosphorylés spécifiques de la protéine tau et anticorps anti- $\beta$ -actine servant de protéine contrôle.

La Figure 26 présente l'analyse densitométrique des immunoblots précédemment décrits (Figure 25). Pour la majorité des épitopes phosphorylés examinés, à l'exception de l'épitope 12E8, après l'augmentation initiale de la phosphorylation de la protéine tau, une diminution est observée allant jusqu'à, par exemple, une disparition totale de l'immunoréactivité après 24 heures pour l'anticorps AT-8.

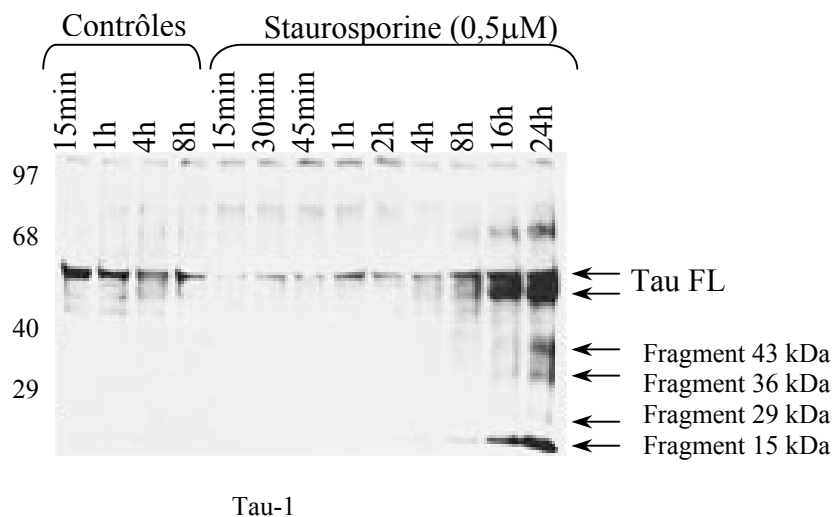


**Figure 26 :** Analyse densitométrique des western blots utilisant les anticorps anti-tau phosphorylés de la Figure 25. Les barres contrôles représentent la moyenne des 4 contrôles à 15 min, 1h, 4h et 8h. Les valeurs sont normalisées par rapport à l'actine- $\beta$ .

Par opposition à ce qui a été observé pour la plupart des épitopes phosphorylés, la staurosporine induit une diminution de la phosphorylation de tau pour l'épitope 12E8. Cette diminution a été observée après 15 minutes d'exposition à la staurosporine et est maintenue même si l'exposition à la staurosporine est prolongée jusqu'à 24 heures (Figure 25 et Figure 26).

**Nous nous sommes demandés si la diminution tardive de la phosphorylation de tau était due à une déphosphorylation de tau ou bien à une diminution de la quantité de tau liée à la mort neuronale.** C'est pourquoi, nous avons utilisé l'anticorps Tau-1 qui est le complémentaire de l'anticorps AT-8 puisqu'il va reconnaître le même site mais lorsque celui-ci est déphosphorylé.

La Figure 27 montre qu'avec l'anticorps Tau-1 on a une diminution précoce de la déphosphorylation, dans les 15 premières minutes d'exposition à la staurosporine. Puis, la déphosphorylation commence à augmenter après 1 heure d'exposition et continue jusqu'à 24 heures d'exposition à la staurosporine. Cette déphosphorylation de tau augmente fortement après 8 heures d'exposition à la staurosporine et elle est associée avec le clivage de tau. En effet, après 8, 16 et 24 heures d'exposition, l'anticorps Tau-1 détecte une échelle de fragments de tau déphosphorylée, incluant un fragment final de tau de 15 kDa.



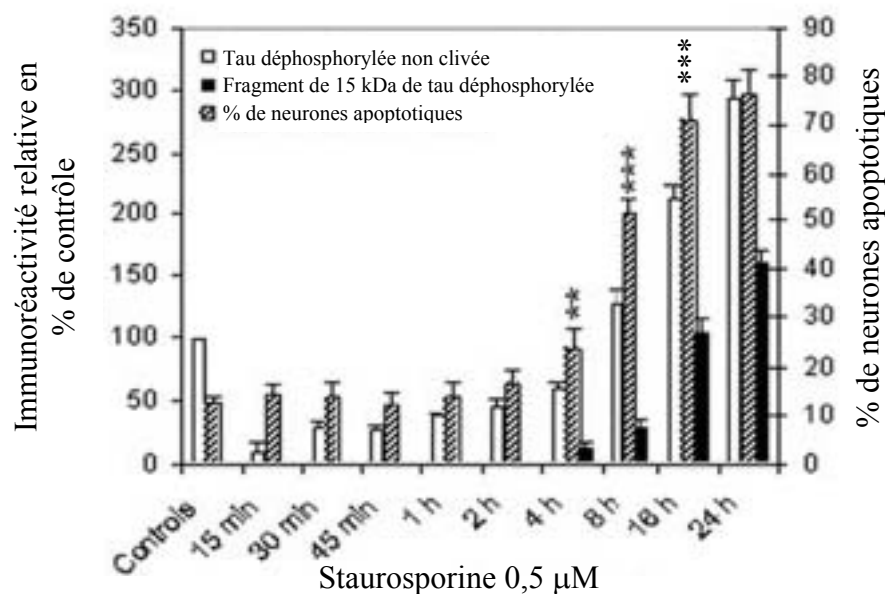
**Figure 27 : Analyse par western blot de la déphosphorylation de tau pendant l'apoptose induite par la staurosporine.** Anticorps reconnaissant la protéine tau lorsqu'elle est déphosphorylée sur l'épitope Tau-1.

Nous avons donc montré qu'au cours de l'apoptose neuronale, induite par la staurosporine, **la phosphorylation de la protéine tau précède la déphosphorylation** et que **cette déphosphorylation est associée à un clivage** donnant un produit final de 15 kDa.

## **II- Le clivage de la protéine tau est associé avec sa déphosphorylation et est corrélé avec l'apparition de caractères apoptotiques**

Nous avons donc vu précédemment dans le western blot de la Figure 27 qu'avec l'anticorps Tau-1, la déphosphorylation de tau commence par diminuer au cours de l'exposition à la staurosporine pour ensuite augmenter à partir d'1 heure d'exposition (voir Figure 28 pour l'analyse densitométrique). De plus, nous pouvons voir que cette augmentation est associée avec le clivage de tau, ce qui coïncide avec l'apparition des caractères morphologiques de l'apoptose. Nous avons observé qu'après 8, 16 et 24 heures d'exposition à la staurosporine, Tau-1 détecte de nombreux fragments intermédiaires de tau déphosphorylés, incluant un fragment final de tau de 15 kDa. Ce fragment est déjà détectable après 4 heures d'exposition, et son niveau augmente avec le pourcentage des neurones apoptotiques. Il faut savoir qu'après traitement des cultures par la staurosporine, une partie des cultures a été utilisée pour réaliser l'étude de la phosphorylation par western blot

(précédemment décrite) et une partie a été utilisée afin de réaliser l'étude de l'apoptose (DAPI). Après 4, 8, 16 et 24 heures d'exposition à la staurosporine, le pourcentage de neurones apoptotiques dans les cultures est respectivement de 23,6% ( $p < 0,01$ ), 51,2% ( $p < 0,001$ ), 70,8% ( $p < 0,001$ ) et 75,7% ( $p < 0,001$ ). Les valeurs d'intensité correspondantes du fragment de 15 kDa sont de 14, 28, 106 et 161,1 (en unités arbitraires). Donc, plus on détecte de fragments déphosphorylés de tau, plus on a d'apoptose.



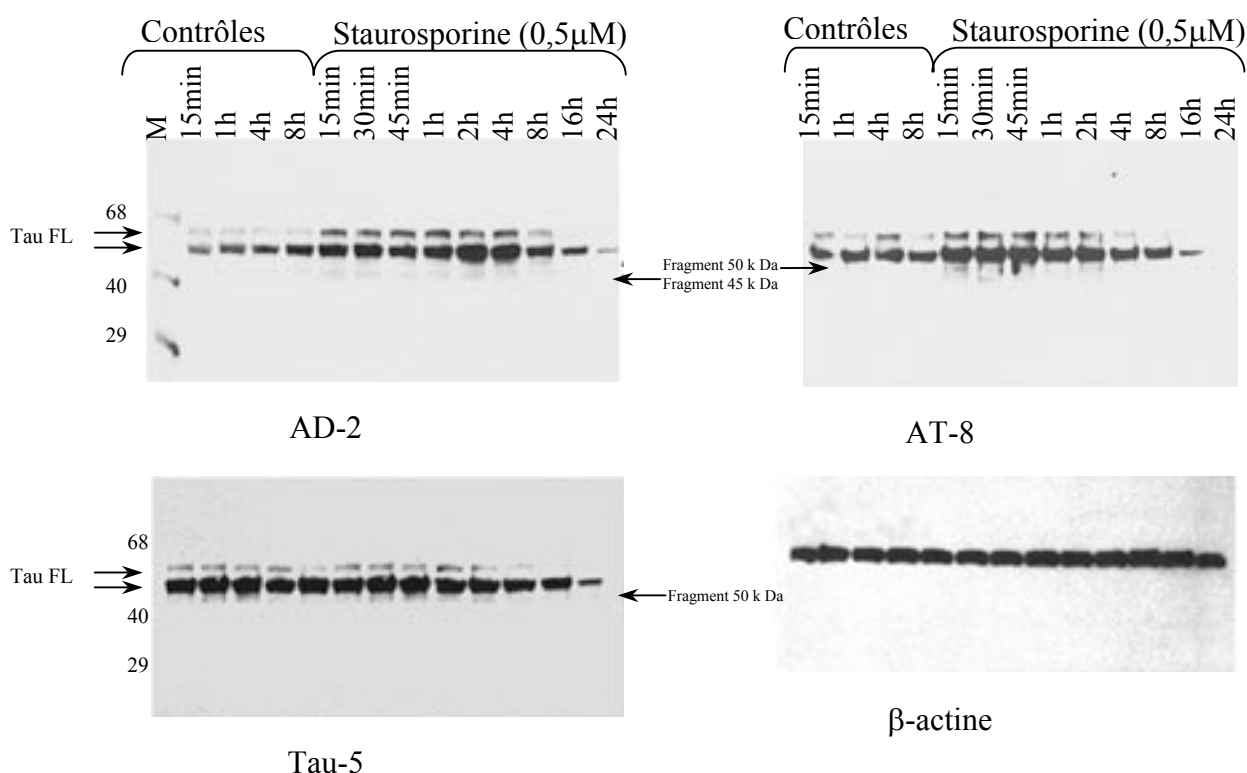
**Figure 28 : Analyse densitométrique des western blots utilisant l'anticorps anti-tau déphosphorylée et quantification de l'apoptose.** Les barres contrôles représentent la moyenne des 4 contrôles à 15 min, 1h, 4h et 8h. Les immunoréactivités sont exprimées en fonction des pourcentages de contrôles et sont normalisées par rapport à l'actine- $\beta$ . \*\*,  $p < 0,01$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$  comparés avec l'apoptose dans les cultures contrôles.

Nous avons ainsi démontré qu'il existe une séquence précise des événements de l'état de phosphorylation de tau. En effet **la phosphorylation (ou hyperphosphorylation) de la protéine tau précède sa déphosphorylation qui est suivie par son clivage et la déphosphorylation et le clivage de tau sont corrélés avec l'apoptose.**

Par ailleurs, Chung et collaborateurs (2001) ont démontré que le clivage de tau apparaît au cours de l'apoptose neuronale induite par la staurosporine dans des cultures de neurones corticaux. Ce clivage mène à l'apparition d'un fragment de 50 kDa qui représente les résidus 1 à 421. De plus, en utilisant un système acellulaire, ces auteurs ont montré que la protéine tau recombinée peut être clivée par la caspase-3 au niveau de l'Asp<sup>421</sup>. Ces données ont été récemment confirmées par Gamblin et collaborateurs en 2003. Dans leur étude, le clivage de tau apparaît au cours de l'apoptose dans des cultures de neurones exposés au peptide



$\beta$ -amyloïde (1-42). Ce clivage génère une protéine tau tronquée où il manque les 20 derniers acides aminés C-terminaux. La protéine tronquée correspond à un fragment de 50 kDa et peut s'assembler plus facilement en filaments par rapport à la forme sauvage de tau. Les deux études montrent que le fragment de 50 kDa peut être détecté par l'anticorps Tau-5, lequel reconnaît les résidus 210-230 de tau indépendamment de son état de phosphorylation. Ce fragment a aussi été détecté de façon spécifique par Tau-C3, un anticorps monoclonal reconnaissant les fragments clivés de tau dirigé contre les résidus 412-421 (Gamblin et al, 2003).

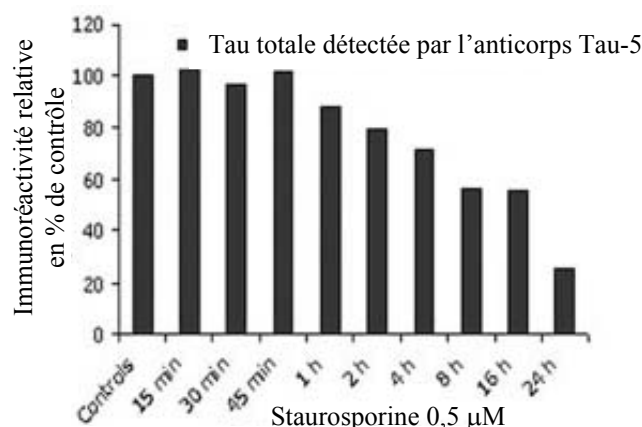


**Figure 29 :** Western blots réalisés avec 50  $\mu$ g de protéines totales extraites avec du tampon de Laemmli modifié. Anticorps reconnaissant des épitopes phosphorylés spécifiques de tau (AD-2 et AT-8). La protéine totale a été détectée par l'anticorps Tau-5. L'anticorps anti- $\beta$ -actine sert de protéine contrôle

Dans notre étude, nous avons détecté une faible quantité d'un fragment de tau de 45 kDa avec l'anticorps AD-2 reconnaissant tau phosphorylée après 15 minutes d'exposition à la staurosporine (Figure 29). L'anticorps anti-tau phosphorylée, AT-8, et l'anticorps anti-tau phospho-indépendant, Tau-5, détectent à peine le fragment de 50 kDa. Or cela ne semble pas en accord avec les résultats des équipes de Chung et collaborateurs (2001) et de Gamblin et collaborateurs (2003) qui ont clairement détecté un fragment de 50 kDa. De plus, en accord

avec les données rapportées par Canu et collaborateurs en 1998, nous avons montré dans la Figure 27 que seul l'anticorps anti-tau déphosphorylée (Tau-1) était capable de détecter de nombreux fragments de tau générés par l'apoptose, dont principalement un fragment de 15 kDa de tau (17 kDa pour Canu et collaborateurs).

La quantité de protéine tau totale détectée par Tau-5 diminue en fonction du temps pendant l'exposition à la staurosporine (Figure 30).



**Figure 30 : Analyse densitométrique du western blot utilisant l'anticorps anti-tau phospho-indépendant Tau-5.** Les immunoréactivités sont exprimées en fonction des pourcentages de contrôles et normalisées par rapport à l'actine- $\beta$ .

Pour comprendre pourquoi nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats que ceux décrits par les équipes de Chung et de Gamblin nous nous sommes intéressés à leurs protocoles expérimentaux (Chung et al, 2001 ; Gamblin et al, 2003). Divers éléments nous ont amené à penser que ces différences pouvaient être dues aux compositions variées des tampons d'extraction de protéines utilisés.

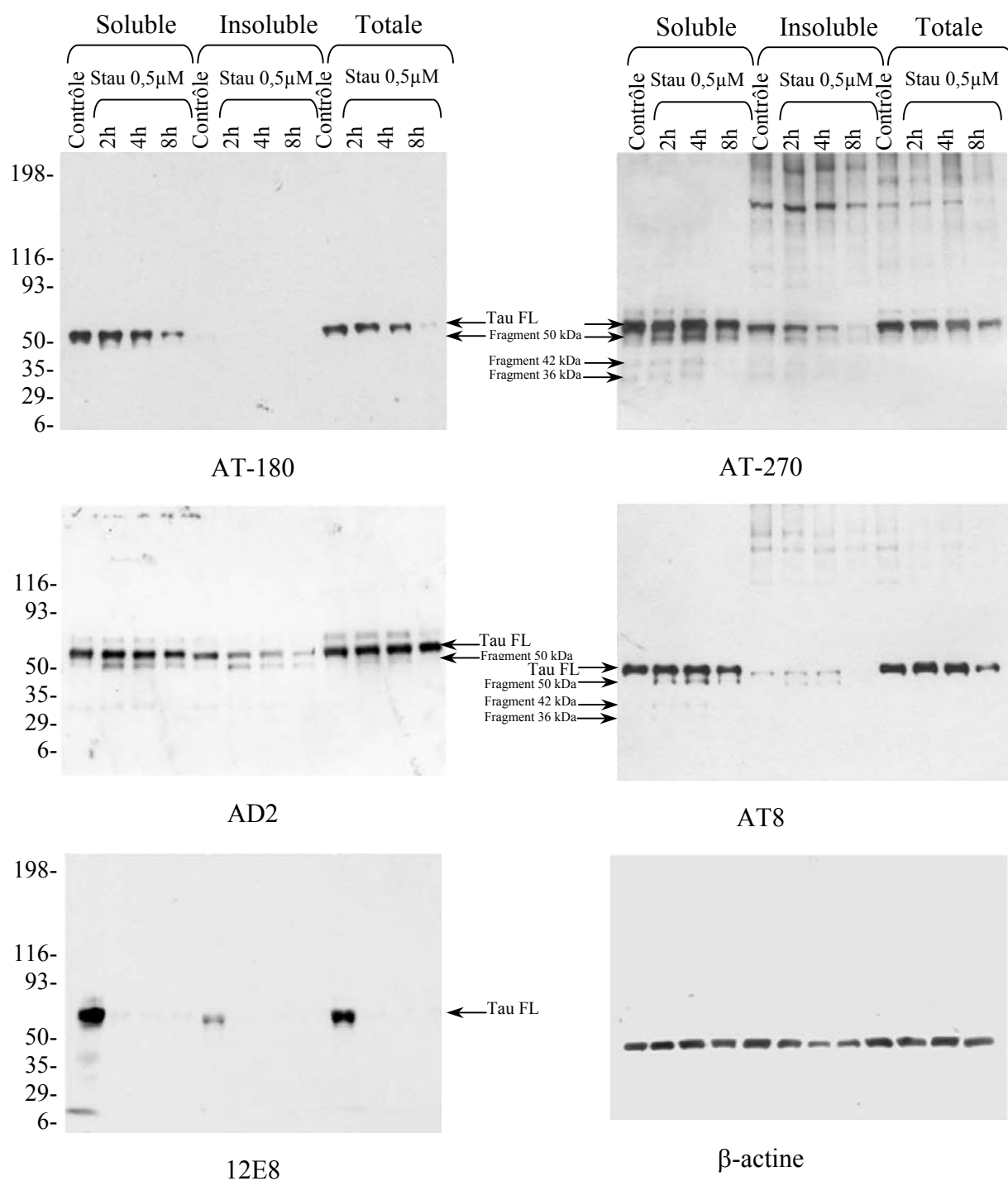
Les western blots présentés dans les figures (Figure 25, Figure 27, Figure 29) de ce travail, ont été exécutés avec des échantillons extraits dans un tampon de Laemmli modifié contenant 2% de détergent ionique, le SDS et des inhibiteurs de phosphatases et de protéases.

Chung et collaborateurs (2001) ont utilisé des échantillons extraits dans un tampon de Laemmli sans inhibiteurs de phosphatases ni de protéases, tandis que Gamblin et collaborateurs (2003) ont réalisé leur extraction cellulaire dans un tampon stabilisateur qui contient 1% de détergent non ionique, le triton et une petite quantité de SDS (0,1%).

Nous avons tout d'abord réalisé des western blots sur des cellules lysées avec du tampon de Laemmli sans inhibiteurs de phosphatases et de protéases. Cependant, nous n'avons pas réussi à observer les fragments de la protéine tau avec les anticorps anti-tau phospho-indépendant et phospho-dépendant décrits par Chung et collaborateurs (2001) et avons obtenus les mêmes immunoblots que précédemment (Figure 25, Figure 27, Figure 29).

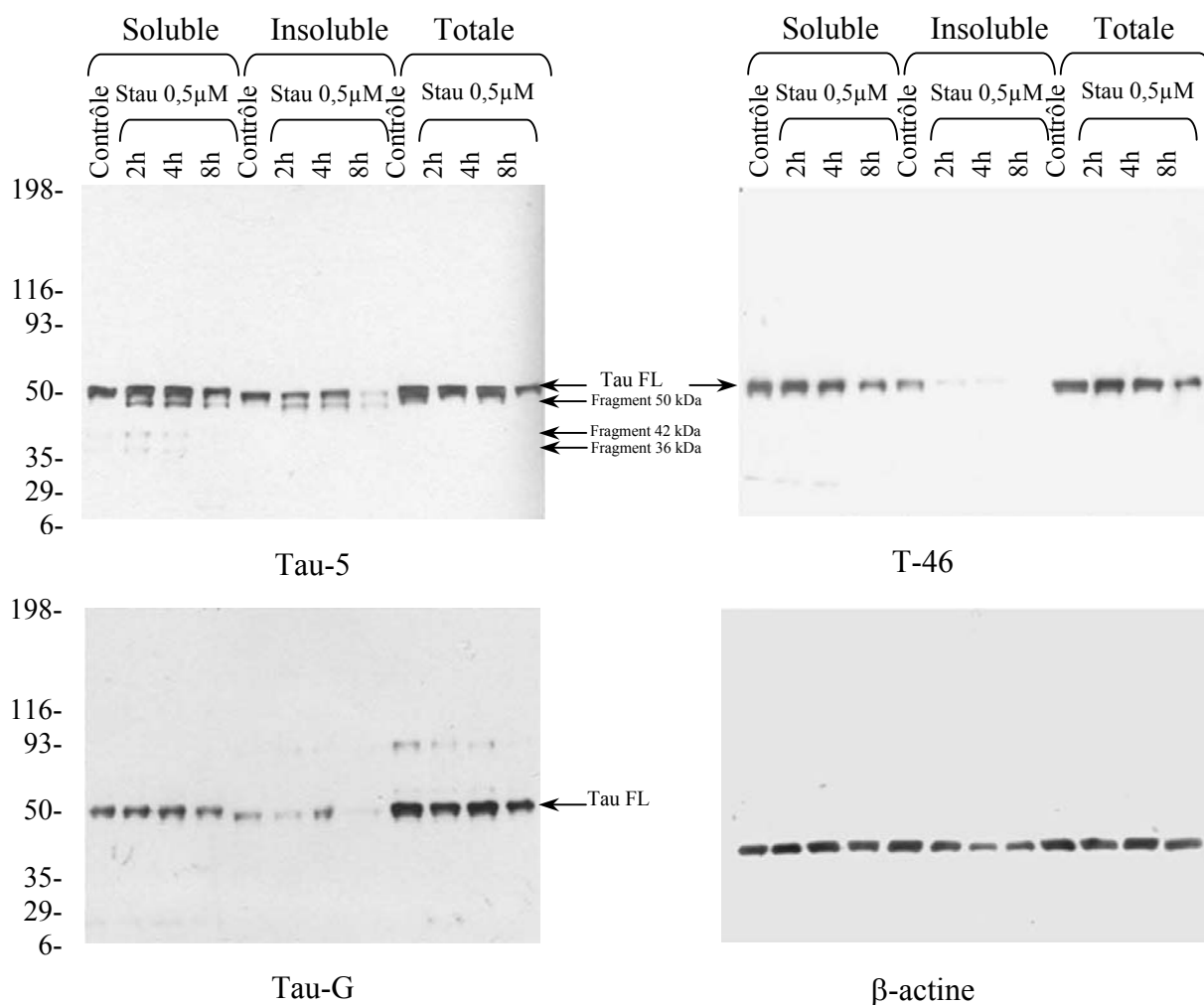
Nous avons ensuite utilisé un tampon contenant du triton comme détergent et des inhibiteurs de phosphatases et de protéases (tampon similaire à celui de Gamblin et collaborateurs, 2003) pour réaliser l'extraction cellulaire selon la procédure décrite par Jenkins et collaborateurs en 2000. Ce protocole a été utilisé pour séparer les différentes fractions de tau en fraction soluble et fraction insoluble (ou liée) en incubant les cultures dans du tampon d'extraction à 37°C pendant 10 minutes. Les fractions obtenues ont ensuite été mélangées avec du tampon Laemmli 2X (v/v) et dénaturées par la chaleur. En parallèle, nous avons lysé les cellules avec du tampon de Laemmli modifié pour obtenir une fraction de protéines totales. La phosphorylation et le clivage de tau ont ensuite été analysés dans les fractions soluble, insoluble et totale.

Dans la **fraction totale**, ni les anticorps anti-tau phosphorylée (AT-8, AT-180, AT-270, AD-2 et 12E8), ni les anticorps anti-tau phospho-indépendants (Tau-5, T-46 et Tau-G) n'ont pu détecter des fragments de tau pendant l'apoptose induite par 0,5  $\mu$ M de staurosporine (Figure 31, Figure 32).



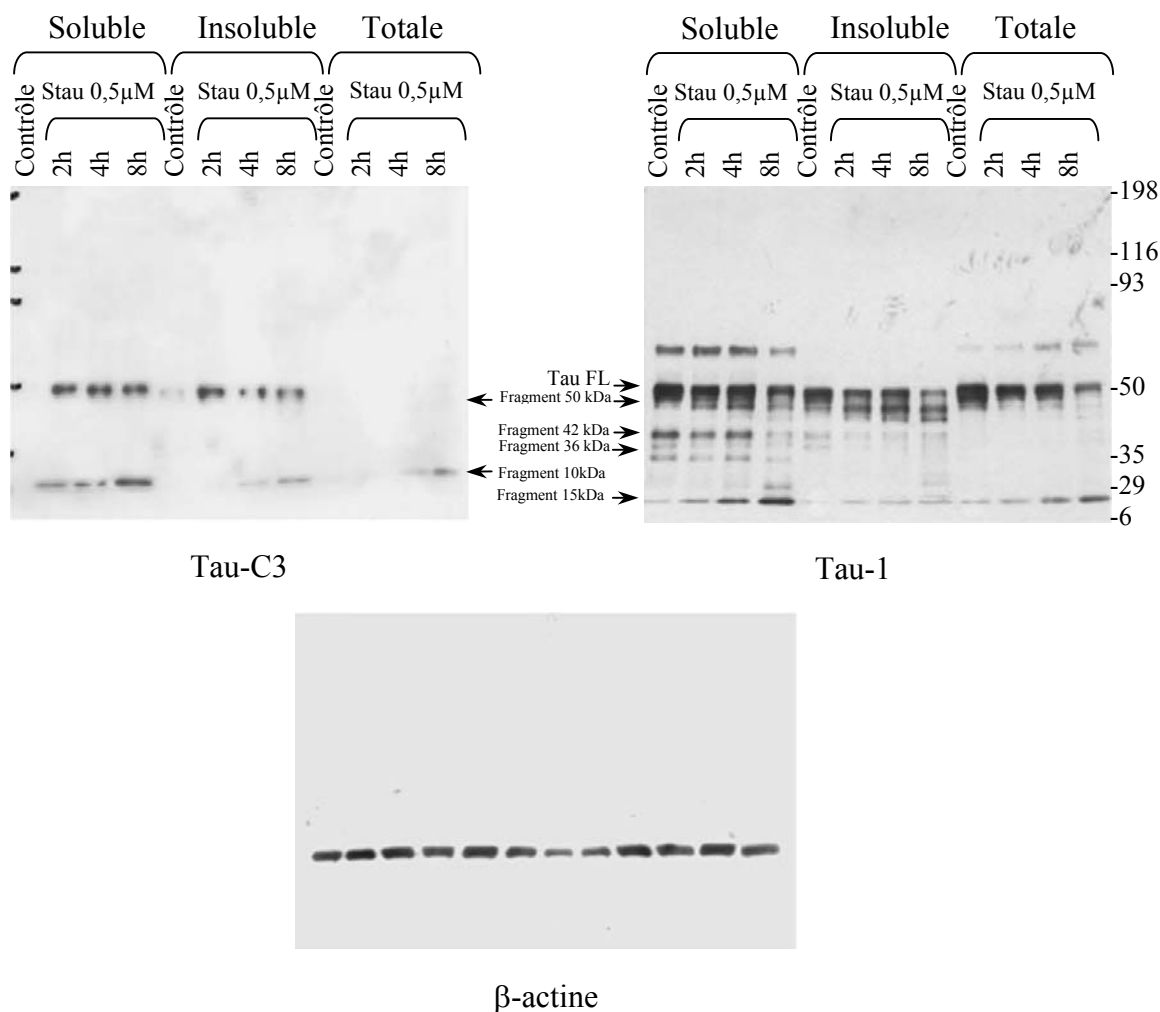
**Figure 31 : Analyse par western blots du clivage et de la distribution dans les fractions totale, soluble et liée de la protéine tau.** Western blots réalisés avec des anticorps anti-tau phospho-dépendants (AT-180, AT-270, AD-2, AT-8 et 12E8) et l'anticorps anti-β-actine.

Sur la Figure 32, les western blots utilisant les anticorps anti-tau phospho-indépendants, Tau-5, T-46 et Tau-G révèlent que la quantité de protéine tau totale diminue en fonction du temps après 2, 4 et 8 heures d'exposition à la staurosporine.



**Figure 32 : Analyse par western blots du clivage et de la distribution dans les fractions totale, soluble et liée de la protéine tau.** Western blots réalisés avec des anticorps anti-tau phospho-indépendants (Tau-5, T-46, et Tau-G) et l'anticorps anti- $\beta$ -actine.

Nous avons également analysé le clivage de tau par l'anticorps Tau-C3, qui détecte de façon spécifique le fragment de 50 kDa (Figure 33). Dans la fraction totale, cet anticorps détecte très peu de fragments de 50 kDa même après 8h d'exposition à la staurosporine. Cela confirme ce que nous avons obtenu avec les anticorps anti-tau phospho-indépendants. De plus, Tau-C3 détecte un fragment de 10 kDa après 4 heures d'exposition à la staurosporine. Ce fragment est différent du fragment de 15 kDa détecté par l'anticorps Tau-1, car il n'y a pas de chevauchement entre les épitopes reconnus par ces anticorps. En effet, Tau-C3 est dirigé contre les résidus 412-421 alors que Tau-1 reconnaît seulement les sérines 195, 198, 199, 202 et la thréonine 205 quand elles sont déphosphorylées.



**Figure 33 : Analyse par western blots du clivage et de la distribution dans les fractions totale, soluble et liée de la protéine tau.** Utilisation de l'anticorps anti-tau phospho-dépendant (Tau-1), de l'anticorps Tau-C3 détectant de façon spécifique les fragments 50 kDa et de l'anticorps anti-β-actine.

En résumé, dans la fraction totale obtenue à partir des cultures exposées à 0,5 µM de staurosporine, seuls les anticorps Tau-1 et Tau-C3 détectent des fragments de tau (à savoir quelques fragments avec Tau-1 et un fragment de 10 kDa et une petite quantité de fragment de 50 kDa avec Tau-C3). Les anticorps qui détectent la protéine tau entière (totale) montrent seulement une diminution du niveau de la protéine tau, ce qui pourrait refléter un clivage et une dégradation de tau.

Les analyses par western blot de la distribution de tau et de son clivage dans les **fractions soluble et insoluble** montrent que la staurosporine augmente la fraction soluble de tau et diminue la fraction insoluble de tau (Figure 31, Figure 32, Figure 33). Par opposition à ce qui a été observé dans la fraction totale, les western blots utilisant des anticorps anti-tau

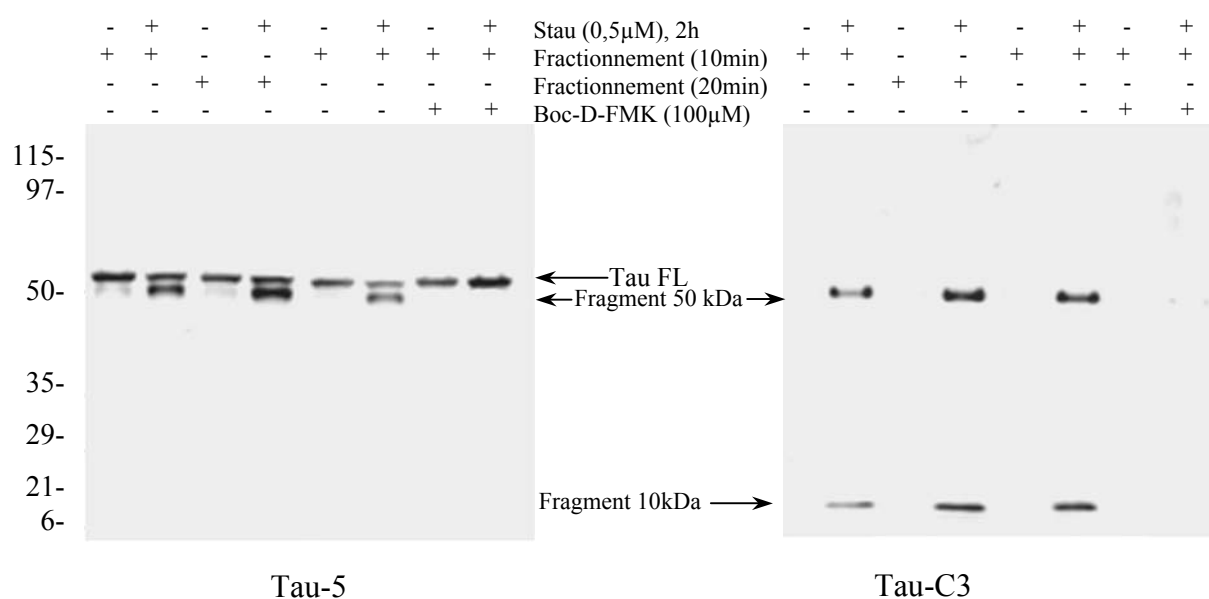
phospho-dépendants (AT-8, AT-180, AT-270 et AD-2) ont détecté des fragments de 50 kDa dans la fraction soluble après 2 heures d'exposition à la staurosporine (Figure 31). Ce fragment a aussi été détecté par l'anticorps anti-tau phospho-indépendant Tau-5 mais pas par les anticorps T-46 et Tau-G (Figure 32). L'anticorps T-46 reconnaît les résidus 404-441 et n'a pas réussi à détecter le fragment de 50 kDa, probablement parce que le clivage au site Asp<sup>421</sup> empêche l'anticorps de se fixer. Les épitopes reconnus par l'anticorps Tau-G sont inconnus. En outre, Tau-C3 détecte de grandes quantités de fragments de 50 kDa à la fois dans les fractions soluble et insoluble en plus du fragment de 10 kDa détecté dans la fraction totale (Figure 33). L'anticorps Tau-1 détecte une échelle de fragments, qui incluent le fragment de 50 kDa aussi bien que des fragments de 42 et 36 kDa et le fragment de 15 kDa. Les fragments de 42 et 36 kDa ne sont pas spécifiques de l'exposition à la staurosporine, car ils sont également détectés dans les contrôles (Figure 33). En résumé, tous les fragments de tau sont principalement trouvés dans la fraction soluble.

**En conclusion, ces expériences montrent que, selon le procédé d'extraction de protéines utilisé, les fragments observés pour le clivage de tau peuvent différer.**

Le tampon d'échantillon Laemmli modifié que nous utilisons est plus efficace dans le blocage des activités enzymatiques (c'est-à-dire l'inhibition des protéases) que les tampons utilisés dans les autres études. En effet, il contient une relativement forte concentration de SDS (2%), qui réduit les protéines et inactive irréversiblement les enzymes telles que les protéases. Dans notre étude, la présence de fragments de 50 kDa dans la fraction soluble ne peut pas être simplement considérée comme un « artefact expérimental » car ce fragment n'apparaît qu'après exposition à la staurosporine. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que, pendant le fractionnement des protéines, ce clivage puisse apparaître, en particulier, dans les extraits de cultures exposés à la staurosporine. En effet, la protéine tau soluble pourrait alors être plus efficacement clivée par les caspases activées par la staurosporine, ce qui expliquerait pourquoi nous détectons facilement le fragment de 50 kDa de tau. Le tampon de fractionnement contient un mélange d'inhibiteurs de protéases qui pourrait alors être inefficace dans le blocage des caspases activées par la staurosporine.

Pour tester cette possibilité, des cultures ont été exposées à 0,5  $\mu$ M de staurosporine pendant 2 heures. Le fractionnement de tau a été réalisé dans du tampon sans l'inhibiteur des caspases Boc-D-FMK, les anticorps Tau-C3 et Tau-5 ont détecté une grande quantité de

fragments de 50 kDa dans les cultures exposées à la staurosporine (Figure 34). Tau-C3 a également détecté un fragment de 10 kDa. La quantité de ces fragments augmente lorsque le temps de fractionnement est prolongé de 10 à 20 minutes. L'inhibition par Boc-D-FMK empêche presque complètement la génération des fragments de 50 et 10 kDa. Ces expériences ont clairement démontré que ces fragments de tau sont générés à des niveaux détectables lors de l'extraction. Dans notre étude, l'absence de fragment de 50 kDa dans la fraction totale pourrait être due à sa présence à des niveaux trop faibles pour être détectée. Ceci peut résulter de sa rapide dégradation en fragments plus petits, principalement de 10 et de 15 kDa.



**Figure 34 : Analyse du clivage de la protéine tau durant le fractionnement de tau.** Les western blots ont été réalisés avec l'anticorps anti-tau phospho-indépendant (Tau-5) et l'anticorps Tau-C3 détectant de façon spécifique les fragments de 50 et de 10 kDa.

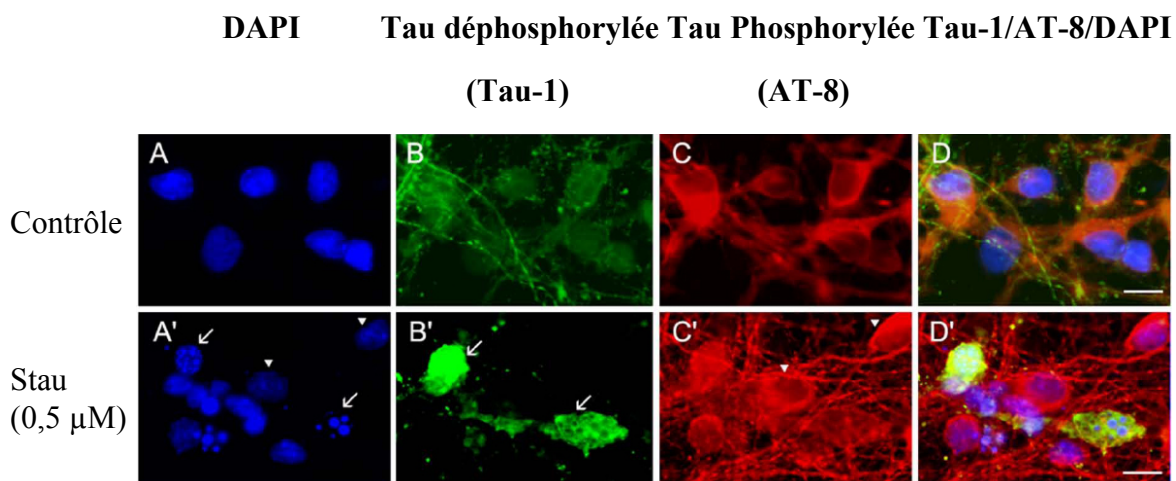
Après avoir évalué ces différents tampons, nous avons montré que certains procédés d'extraction pouvaient induire un clivage « artéfactuel ». Pour éliminer ce clivage « artéfactuel » il faut ajouter des inhibiteurs de protéases et de phosphatases et augmenter la concentration de SDS à 2%. **Nous avons donc décidé d'utiliser par la suite le tampon d'échantillon de Laemmli modifié comme tampon de lyse cellulaire afin de ne plus avoir ce clivage supplémentaire lié au protocole d'extraction.**



### **III- Un changement de distribution de la protéine tau déphosphorylée est observé dans les neurones apoptotiques**

Nous avons montré précédemment que la phosphorylation précède la déphosphorylation et le clivage de tau au cours de l'apoptose. La suite de notre travail consiste à évaluer *in situ* les relations qui peuvent exister entre les changements de phosphorylation de tau, l'apparition des caractères apoptotiques et les changements de localisation de la protéine tau.

Pour cela, l'apoptose est induite par 0,5  $\mu\text{M}$  de staurosporine pendant 8 heures. L'état de phosphorylation de la protéine tau dans les neurones individuels est analysé *in situ* par les techniques d'immunocytochimie utilisant les anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine tau selon son état de phosphorylation. Un double marquage est réalisé avec l'anticorps anti-tau phosphorylée, AT-8, et l'anticorps anti-tau déphosphorylée, Tau-1 (Figure 35). Ces marquages mutuellement exclusifs ont été combinés avec un marquage nucléaire au DAPI pour analyser l'apoptose. Dans les cultures contrôles, tous les neurones montrent pour tau déphosphorylée peu de marquage dans le corps cellulaire et un faible marquage dans les neurites en croissance (Figure 35B), tandis qu'un marquage fort et dominant pour tau phosphorylée est trouvé à la fois dans les prolongements neuronaux et les corps cellulaires (Figure 35C). Dans les cultures traitées par la staurosporine, les neurones avec des noyaux non-apoptotiques (Figure 35A') augmentent leur immunoréactivité pour AT-8 (Figure 35C'), tandis que l'immunoréactivité de tau déphosphorylée est absente (Figure 35B') par rapport aux neurones des cultures contrôles. Pour la majorité des neurones apoptotiques, l'immunoréactivité de tau déphosphorylée augmente dans les corps cellulaires neuronaux et dans les neurites en dégénérescence (Figure 35B'), tandis que nous n'observons pas de marquage pour l'anticorps anti-tau AT-8 (Figure 35C').



**Figure 35 : Analyse de la phosphorylation de tau dans les neurones individuels pendant l'apoptose induite par la staurosporine.** Un double marquage par Tau-1 (vert, reconnaissance de tau déphosphorylée) et AT-8 (rouge, reconnaissance de tau phosphorylée) est combiné à un marquage des noyaux au DAPI (bleu). A-D, cultures contrôles non traitées ; A'-D', cultures traitées à la staurosporine. Barre d'échelle : 8 µM.

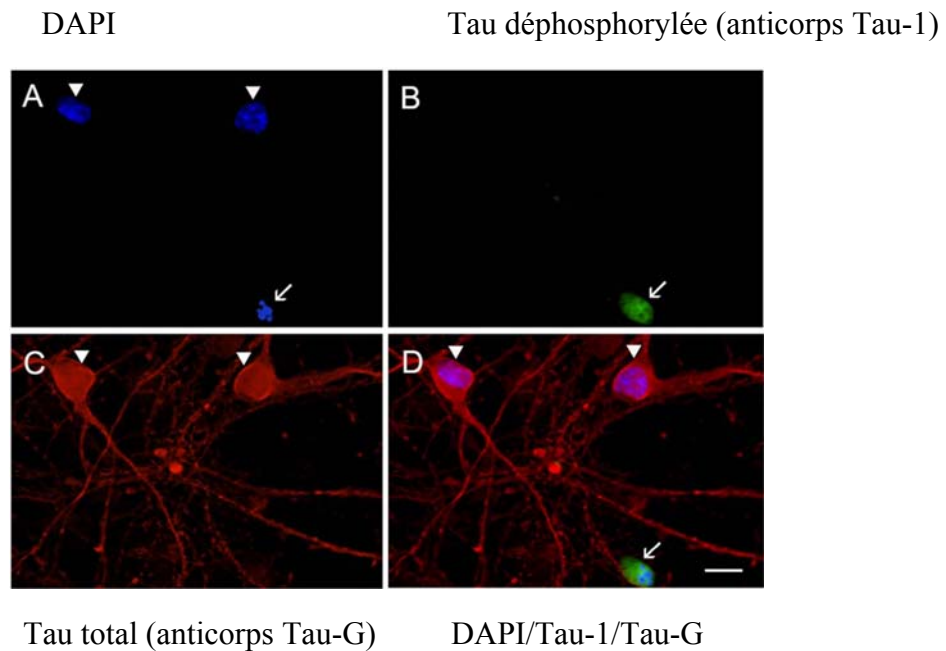
L'analyse quantitative des neurones ayant une distribution anormale de protéine tau déphosphorylée montre que dans les cultures contrôles moins de 1% des neurones sont Tau-1 positifs. Dans les cultures exposées à 0,5 µM de staurosporine pendant 8 heures,  $62 \pm 3\%$  de neurones apoptotiques exposés ont un changement de localisation de l'immunoréactivité de tau déphosphorylée (Tau-1 positif) et  $38 \pm 4\%$  de neurones apoptotiques étaient Tau-1 négatif. Aucun des neurones apoptotiques exposés ne présente d'immunoréactivité pour tau phosphorylée (au moins à l'épitope d'AT-8). Cela indique que 38% des neurones apoptotiques sont à la fois AT-8 et Tau-1 négatifs. L'absence d'immunoréactivité pour Tau-1 dans quelques-uns des neurones apoptotiques pourrait indiquer qu'ils sont à des stades avancés d'apoptose. Le peu de neurones apoptotiques (apoptose spontanée) et Tau-1 positifs trouvés dans les cultures contrôles (<1%) suggère que le changement de localisation de tau déphosphorylée est une constante de l'apoptose neuronale et ne dépend pas de la nature de l'inducteur d'apoptose.

## IV- Le changement de localisation de tau déphosphorylée lié à l'apoptose est dû au clivage de tau et non à sa déphosphorylation

Les changements dans la localisation de la protéine tau déphosphorylée amènent à se demander si ils sont liés à la déphosphorylation de tau elle-même ou secondaires à son clivage.

L'analyse par western blot a démontré que l'anticorps Tau-G, qui reconnaît tau indépendamment de son état de phosphorylation, ne détecte pas les fragments de tau générés par l'apoptose mais détecte la forme entière de tau (Figure 32).

L'immunocytochimie utilisant les anticorps Tau-G et Tau-1 combinés avec le marquage nucléaire au DAPI révèle que plus de 98% des neurones apoptotiques Tau-1 positifs ne sont pas marqués avec Tau-G (Figure 36C et D). Or, Tau-1 marque la protéine tau déphosphorylée sous sa forme entière ou clivée. Si la protéine tau se trouvait sous sa forme entière, on devrait observer un double marquage Tau-G/Tau-1, ce qui n'est pas le cas. Nous pouvons donc en déduire que la protéine tau se trouve sous sa forme clivée dans les neurones apoptotiques.

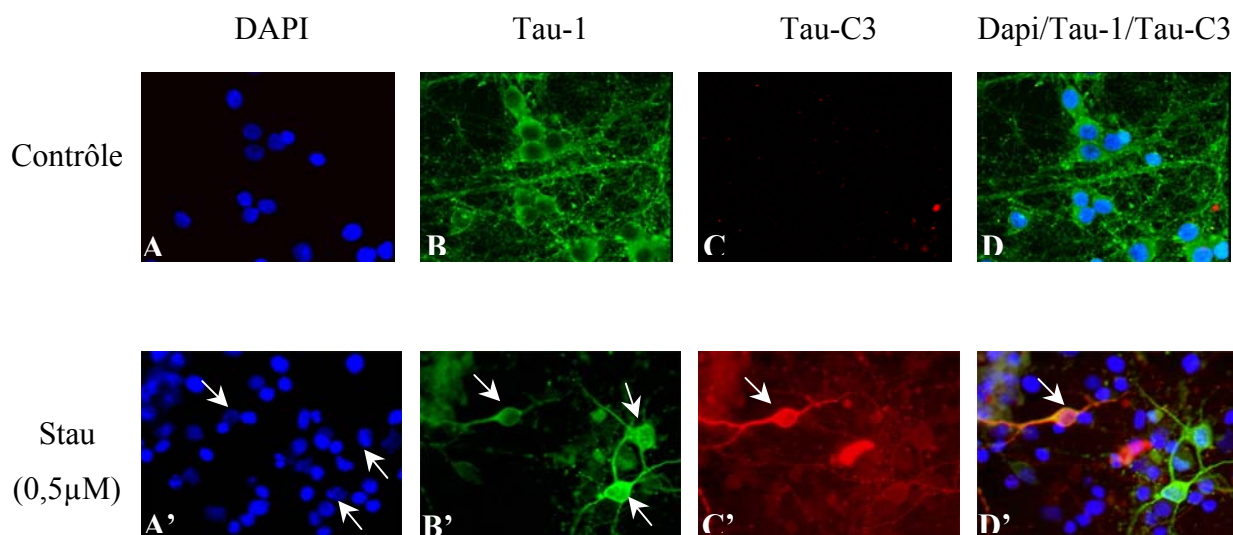


**Figure 36 : Localisation de la protéine tau lors de l'apoptose induite par la staurosporine.** Double marquage par Tau-1 (vert) et Tau-G (rouge) combiné à un marquage des noyaux au DAPI (bleu). Barre d'échelle : 8  $\mu$ M.

**Ceci indique que la distribution anormale de tau dans les neurones apoptotiques est simplement due à son clivage et sa dégradation et pas à sa déphosphorylation.**

Ces observations ont ensuite été confirmées par des expériences dans lesquelles les caspases ont été inhibées (voir paragraphe V, Figure 43).

Afin de montrer la relation existant entre la phosphorylation de tau et son clivage au cours de l'apoptose, nous avons examiné les neurones individuellement et réalisé un double marquage Tau-1/Tau-C3 où Tau-1 permet de mettre en évidence dans les neurones la protéine tau déphosphorylée et Tau-C3 la protéine tau clivée. Les cultures sont également marquées au DAPI révélant ainsi la fragmentation de la chromatine et la condensation des noyaux lors de l'apoptose. Afin d'induire l'apoptose, les cultures sont traitées avec 0,5  $\mu$ M de staurosporine.



**Figure 37 : Relation entre l'apoptose, la phosphorylation et le clivage de la protéine tau.** Des cultures de neurones corticaux sont traitées à la staurosporine (0,5  $\mu$ M) pendant 8 heures. Un double marquage par Tau-1 (vert, reconnaissance de tau déphosphorylée) et Tau-C3 (rouge, reconnaissance de tau clivée) est combiné à un marquage des noyaux au DAPI (bleu). Les flèches montrent les neurones apoptotiques. A-D, cultures contrôles non traitées ; A'-D', cultures traitées par la staurosporine.

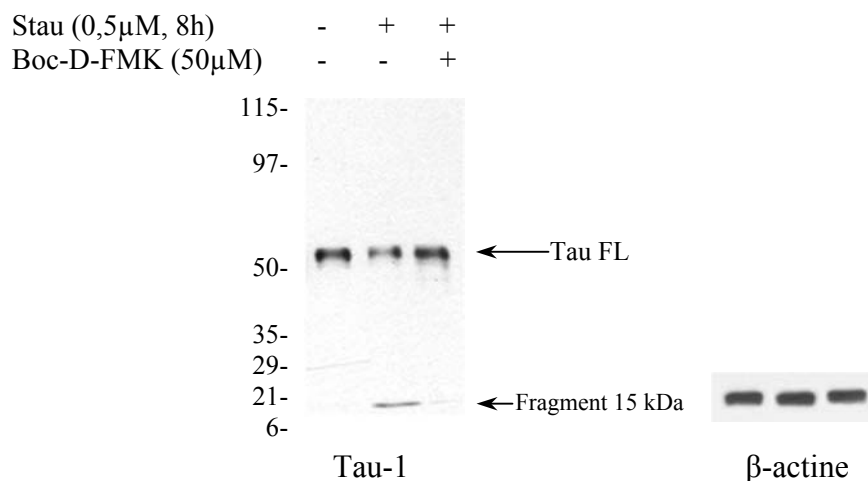
Dans les cultures contrôle (Figure 37B) le marquage par Tau-1 est uniforme et aucun marquage pour Tau-C3 (protéine tau clivée) n'est observé (Figure 37C). Dans les cultures traitées à la staurosporine, la protéine tau déphosphorylée est présente dans les neurones apoptotiques (Figure 37B', flèches) et nous retrouvons la présence de protéine tau clivée (marquage par Tau-C3) dans un neurone apoptotique (Figure 37C', flèche). Lors du traitement à la staurosporine, deux des neurones en apoptose marqués par Tau-1 ne sont pas marqués par Tau-C3, la protéine tau sous forme clivée n'y est donc pas détectée (Figure 37C')

et D'). Tous les neurones Tau-C3 positifs sont Tau-1 positifs mais l'inverse n'est pas vrai. Cela indique, *in situ*, que **la déphosphorylation de tau précède son clivage**, puisque dans les neurones apoptotiques, quand tau est clivée, elle est déphosphorylée, alors que l'on retrouve des neurones apoptotiques avec tau déphosphorylée sans être clivée.

## **V- L'inhibition des caspases restaure une distribution normale de tau déphosphorylée, empêche le clivage de tau et l'apoptose**

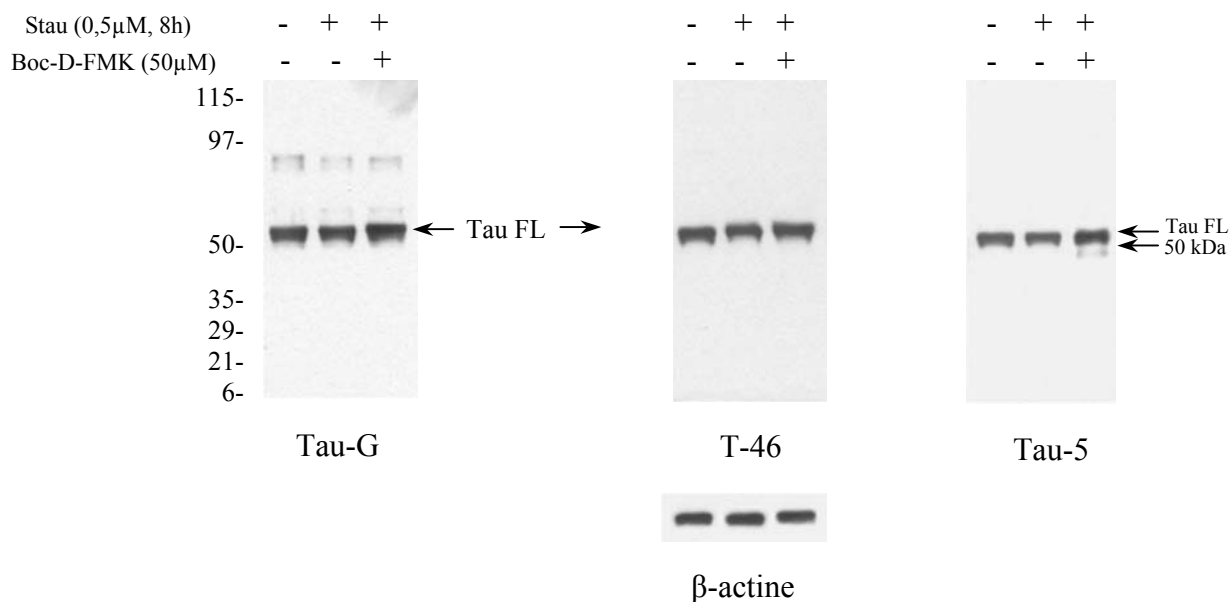
Nous avons montré précédemment que la protéine tau, au cours de l'apoptose, subit tout d'abord une phosphorylation, puis une déphosphorylation et un clivage avec un changement de localisation dans le neurone.

Pour analyser l'implication des caspases dans l'apoptose induite par la staurosporine, les caspases ont été inhibées par inhibiteur pancaspase Boc-D-FMK. Les immunoblots avec les anticorps dirigés contre tau phosphorylée (AT-8, AD-2, AT-270 et 12E8), contre tau déphosphorylée (Tau-1) ou contre tau indépendamment de son état de phosphorylation (Tau-5, T-46 et Tau-G) confirment que la staurosporine réduit les niveaux de forme entière de tau ce qui est la conséquence du clivage et de la dégradation de tau (Figure 38, Figure 39, Figure 40, Figure 42). L'inhibition des caspases par 50  $\mu$ M de Boc-D-FMK empêche efficacement la génération du fragment de tau de 15 kDa et restaure la forme entière de tau déphosphorylée comme le montre le western blot utilisant l'anticorps anti-tau déphosphorylée, Tau-1 (Figure 38).



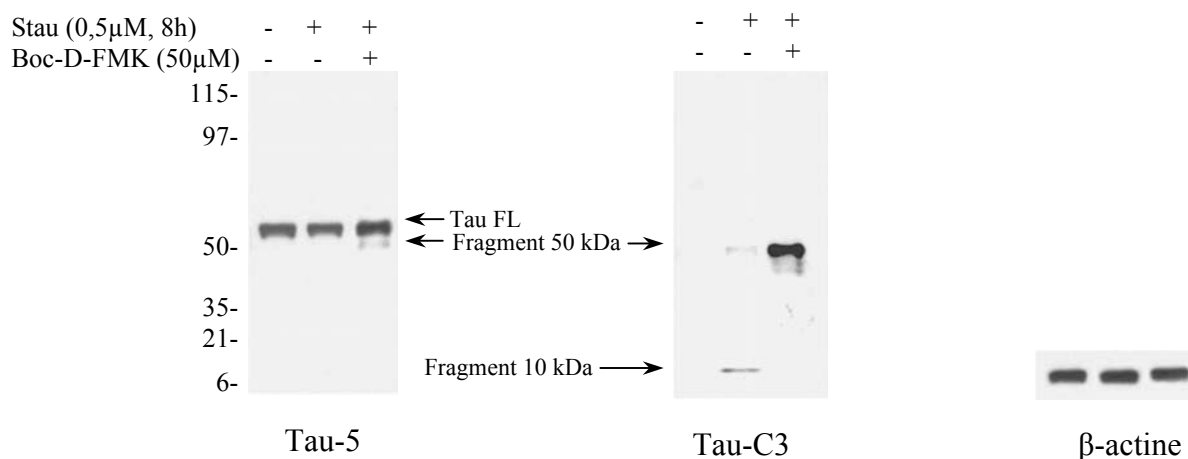
**Figure 38 : Effets de l'inhibition des caspases sur le clivage et l'apoptose de tau.** Western blots réalisés avec l'anticorps anti-tau déphosphorylée (Tau-1) et l'anticorps anti- $\beta$ -actine. Inhibition des caspases par 50  $\mu$ M de Boc-D-FMK.

Les westerns blots utilisant les anticorps Tau-5, T-46 et Tau-G ont montré qu'aucun fragment n'est détecté dans les cultures contrôles ni dans les cultures exposées à la staurosporine ce qui confirme les résultats précédents (voir II). Ils montrent également que l'inhibition des caspases restaure la forme tau entière (Figure 39).



**Figure 39 : Effets de l'inhibition des caspases sur le clivage et l'apoptose de tau.** Western blots réalisés avec les anticorps anti-tau totale Tau-G, Tau-5 et T-46 et l'anticorps anti- $\beta$ -actine. Inhibition des caspases par 50  $\mu$ M de Boc-D-FMK.

Il faut cependant remarquer que l'inhibition des caspases par 50  $\mu$ M de Boc-D-FMK mène à l'apparition d'un fragment de 50 kDa avec Tau-5 (Figure 39). La présence du fragment de 50 kDa dans les cultures exposées à la staurosporine en présence de 50  $\mu$ M de Boc-D-FMK est confirmée en utilisant un anticorps anti-tau clivée Tau-C3 (Figure 40). Cet anticorps détecte également un fragment de 10 kDa et un fragment faible de 50 kDa dans les cultures exposées à la staurosporine.

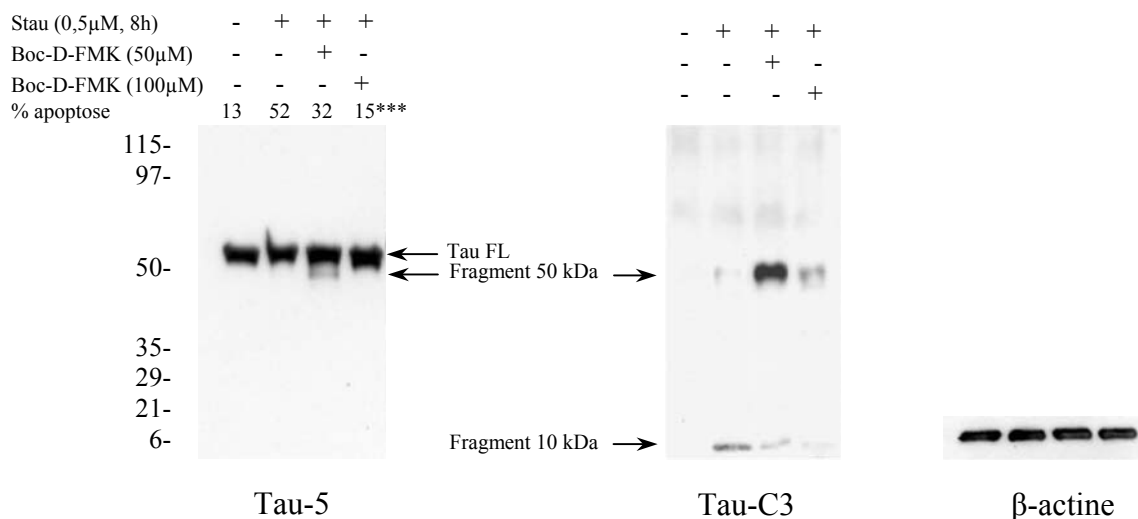


**Figure 40 : Effets de l'inhibition des caspases sur le clivage et l'apoptose de tau.** Western blot réalisés avec les anticorps Tau-5 (tau totale), Tau-C3 (tau clivée) et l'anticorps anti- $\beta$ -actine. Inhibition des caspases par 50  $\mu$ M de Boc-D-FMK.

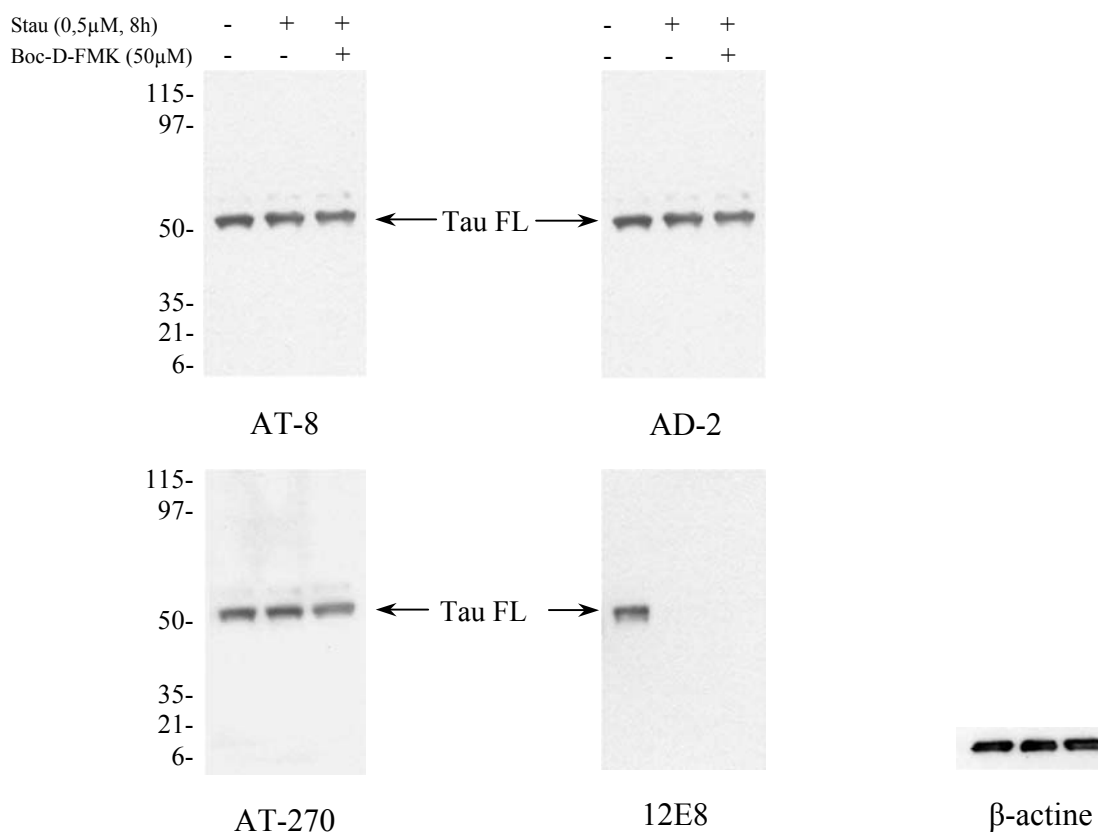
L'inhibition des caspases empêche la génération du fragment de 10 kDa et augmente la génération du fragment de 50 kDa. L'augmentation du fragment de 50 kDa, due à l'inhibition partielle des caspases par 50  $\mu$ M de Boc-D-FMK, ne peut pas résulter d'un clivage de tau additionnel car la forme entière de tau a été restaurée.

De plus, une plus forte inhibition des caspases par 100 $\mu$ M de Boc-D-FMK bloque presque complètement la génération de fragments de tau (à savoir 50 et 10 kDa) (Figure 41). L'inhibition des caspases par 100  $\mu$ M de Boc-D-FMK réduit aussi l'apoptose induite par la staurosporine de 52% à 15% ( $p < 0,001$ ).

Les western blots utilisant les anticorps anti-tau phosphorylée (AT-8, AD2, AT270 et 12E8) ont montré que l'inhibition des caspases ne modifiait pas les quantités de protéine tau phosphorylée dans les neurones exposés à la staurosporine par rapport aux neurones non traités (Figure 42).



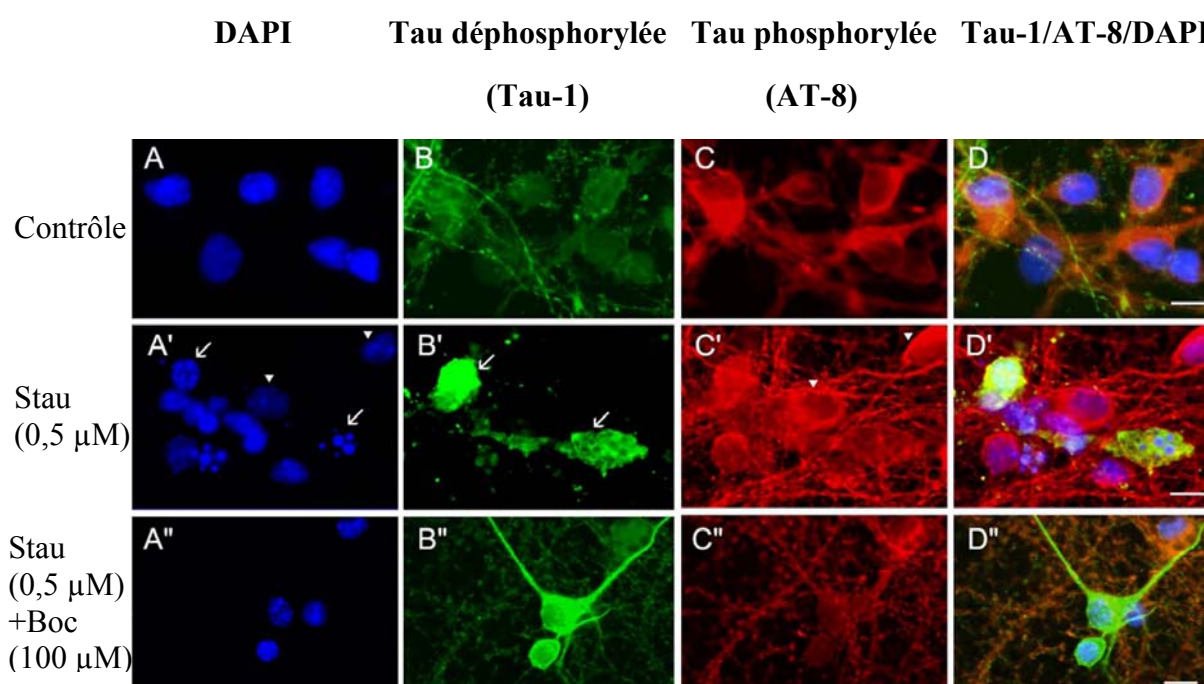
**Figure 41 : Effets de l'inhibition des caspases sur le clivage et l'apoptose de tau.** Les anticorps Tau-5, Tau-C3 et anti- $\beta$ -actine ont été utilisés dans les western blots. L'inhibition des caspases est réalisée avec 50 et 100  $\mu$ M de Boc-D-FMK. \*\*\*,  $p < 0,001$  en comparaison avec l'apoptose induite par la staurosporine dans les cultures contrôles.



**Figure 42 : Effets de l'inhibition des caspases sur le clivage de tau et l'apoptose.** Western blots réalisés avec les anticorps anti-tau phosphorylée AT-8, AT-270, AD-2 et 12E8 et l'anticorps anti- $\beta$ -actine. Inhibition des caspases par 50  $\mu$ M de Boc-D-FMK.



L'analyse de la phosphorylation de tau par immunomarquage avec les anticorps AT-8 et Tau-1 révèle que l'inhibition des caspases par 100  $\mu\text{M}$  de Boc-D-FMK empêche la distribution anormale de tau déphosphorylée mais n'affecte pas la phosphorylation de tau par rapport aux cultures exposées à la staurosporine seule (Figure 43C'', regarder le WB utilisant AT-8 dans la Figure 42). En inhibant les caspases, les neurones non-apoptotiques présentent un fort immunomarquage pour la protéine tau déphosphorylée distribuée à la fois dans les corps cellulaires et dans les neurites (Figure 43B''). **Ces expériences indiquent que le blocage des caspases empêche le clivage de tau et l'apoptose sans interférer avec les changements de phosphorylation de tau induite par la staurosporine.**

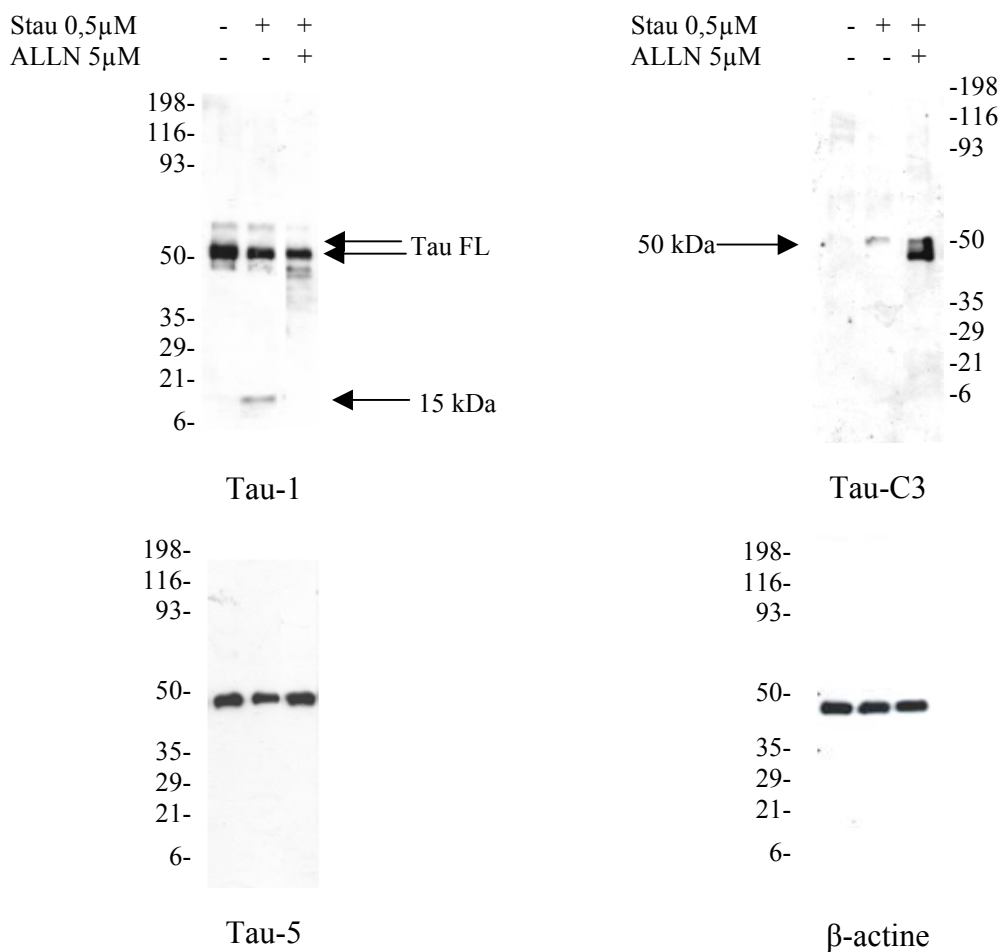


**Figure 43 : Analyse de la phosphorylation de tau dans les neurones individuels pendant l'apoptose par la staurosporine.** Un double marquage par Tau-1 (vert, reconnaissance de tau déphosphorylée) et AT-8 (rouge, reconnaissance de tau phosphorylée) est combiné à un marquage des noyaux au DAPI (bleu). A-D, cultures contrôles non traitées ; A'-D', cultures traitées à la staurosporine ; A''-D'', cultures traitées à la staurosporine et avec l'inhibiteur des caspases Boc-D-FMK. Barre d'échelle : 8  $\mu\text{M}$ .

## VI- Les calpaïnes agissent après le clivage de la protéine tau par les caspases

Pour analyser l'implication d'autres systèmes protéolytiques dans le clivage et la dégradation de la protéine tau au cours de l'apoptose induite par la staurosporine, les calpaïnes sont inhibées par l'inhibiteur des calpaïnes ALLN. Après 8 heures de traitement des

cultures par la staurosporine en présence ou en absence des inhibiteurs, la protéine tau est analysée par western blot. Les immunoblots avec les anticorps dirigés contre tau déphosphorylée (Tau-1), contre tau indépendamment de son état de phosphorylation (Tau-5) et contre la protéine tau clivée (Tau-C3) confirment que la staurosporine réduit les niveaux de forme entière de tau ce qui est la conséquence du clivage et de la dégradation de tau (Figure 44). Après induction de l'apoptose par la staurosporine, la quantité de protéine tau sous forme entière déphosphorylée, diminue par rapport au contrôle, tandis que nous observons la présence d'une bande à 15-17 kDa due à un clivage et une dégradation de tau (anticorps Tau-1). L'inhibition des calpaïnes par 5  $\mu$ M d'ALLN empêche efficacement la génération des fragments de tau de 15-17 kDa mais ne restaure pas la forme entière de tau déphosphorylée. De nombreuses formes intermédiaires de clivage apparaissent comme le montre le western blot utilisant l'anticorps anti-tau déphosphorylée, Tau-1. Nous n'observons pas de protéine tau clivée dans les cultures contrôles sur l'immunoblot utilisant l'anticorps Tau-C3 qui reconnaît les résidus 412 à 421 de la protéine tau lorsqu'elle est clivée après l'Asp<sup>421</sup> (ce qui génère un fragment de 50 kDa). La staurosporine induit une augmentation de la quantité de fragments de 50 kDa. Un blocage du clivage avec une accumulation des fragments de 50 kDa apparaît après inhibition des calpaïnes.

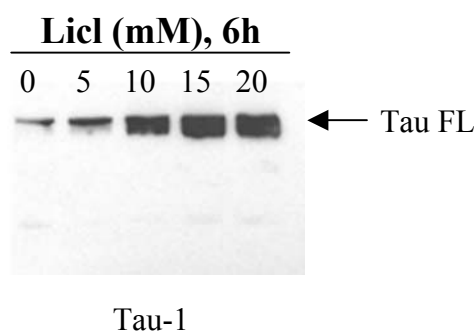


**Figure 44 : Effets de l'inhibition des calpaïnes sur le clivage de la protéine tau.** Immunoblots de cultures traitées par la staurosporine (0,5 μM) et/ou avec l'inhibiteur des calpaïnes ALLN (5 μM). Western blots réalisés avec l'anticorps anti-tau déphosphorylée (Tau-1), l'anticorps anti-tau clivée (Tau-C3), l'anticorps anti-tau phospho-indépendant (Tau-5) et l'anticorps anti-β-actine.

**Cette étude a permis de montrer qu'au cours de l'apoptose neuronale, induite par la staurosporine, la protéine tau est tout d'abord phosphorylée, puis déphosphorylée avant d'être clivée par les caspases et dégradée par les calpaïnes jusqu'à obtention d'un produit final de dégradation de 15-17 kDa.**

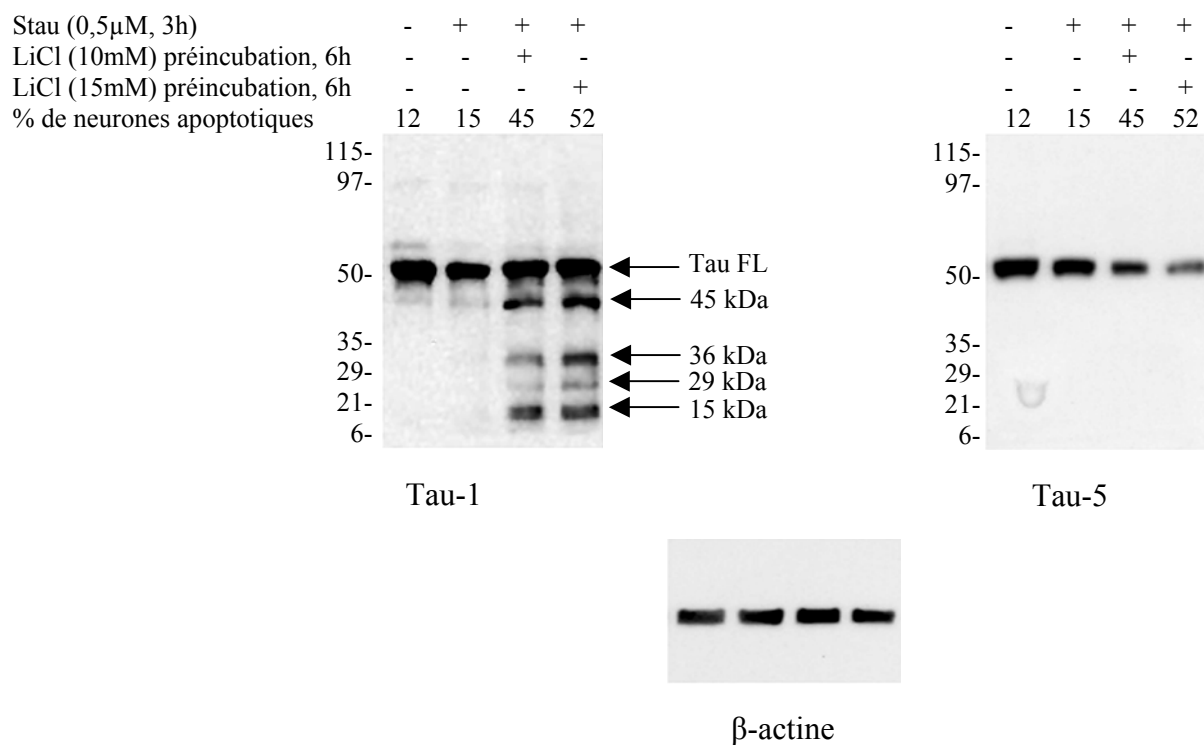
## VII- La déphosphorylation préalable de la protéine tau augmente la vulnérabilité neuronale de l'apoptose et le clivage de tau

Il a été rapporté précédemment que, dans les cellules PC12 différenciées, la déphosphorylation de la protéine tau sur l'épitope Tau-1 caractérise le début de la phase d'exécution de l'apoptose (Mills et al, 1998). De plus, nous avons démontré que la protéine tau au cours de l'apoptose neuronale est déphosphorylée et que cette déphosphorylation est associée au clivage de tau. Si la déphosphorylation de tau est un événement clé dans l'apoptose, alors une déphosphorylation de tau préalable doit mener à une accélération du clivage et de l'apoptose de tau. Pour déterminer si la déphosphorylation de tau est impliquée dans son clivage et dans l'apoptose, tau a été déphosphorylée par l'inhibiteur de la glycogène synthétase kinase-3 $\beta$ , le lithium, et ensuite exposée à 0,5 $\mu$ M de staurosporine. La préincubation des cultures avec le lithium (LiCl) induit une déphosphorylation de la protéine tau (au moins sur l'épitope de Tau-1) sans clivage ni apoptose détectable (Figure 45).



**Figure 45 : Le lithium induit une déphosphorylation croissante de la protéine tau en fonction de sa concentration sans induire de clivage.** Western blot réalisé avec l'anticorps anti-tau déphosphorylée Tau-1.

Le western blot utilisant l'anticorps anti-tau déphosphorylée, Tau-1, montre qu'une exposition à la staurosporine de 3 heures n'induit pas un clivage de tau détectable (Figure 46), tandis qu'une déphosphorylation préalable de tau par le lithium potentialise le clivage de tau et l'apoptose induite par la staurosporine. L'anticorps Tau-5 confirme cet effet potentialisateur du lithium puisque nous voyons une diminution de la quantité de la forme entière de tau (Figure 46).



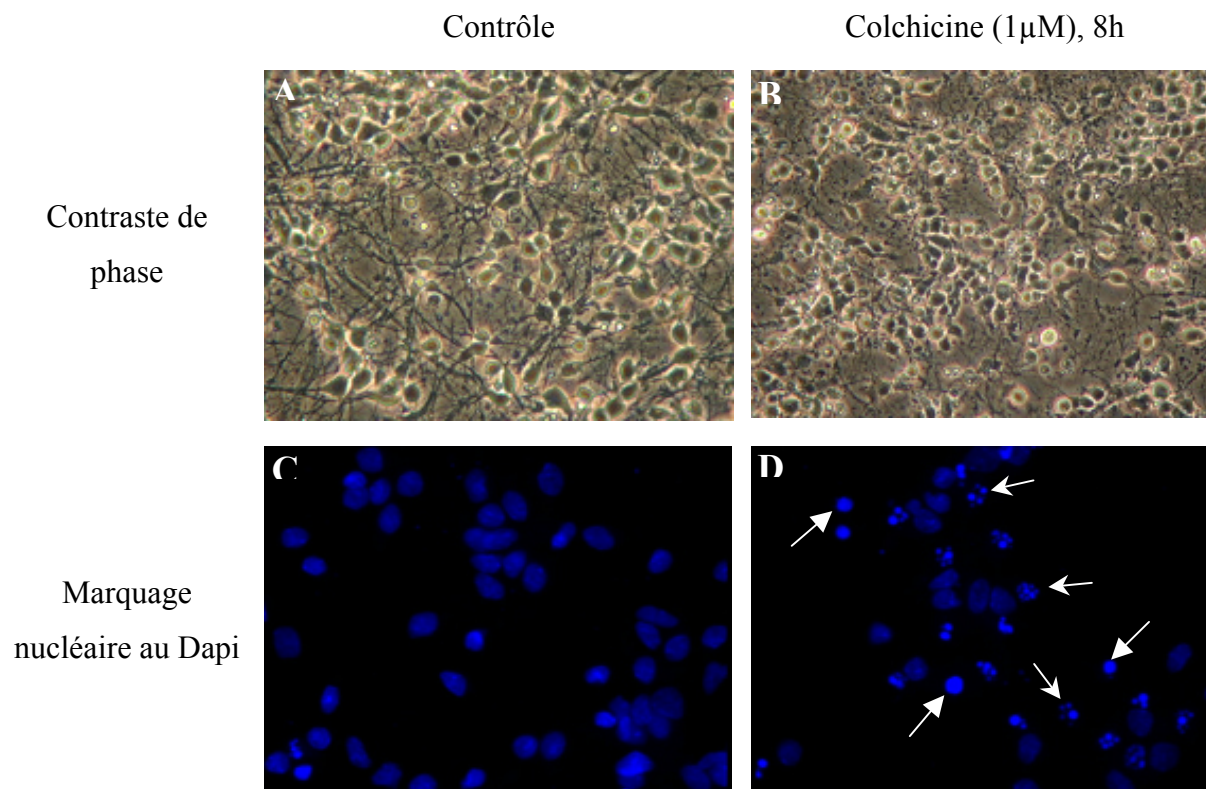
**Figure 46 : Une déphosphorylation de tau au préalable augmente son clivage et sa vulnérabilité neuronale face à l'apoptose.** Cultures traitées par la staurosporine (0,5  $\mu$ M) pendant 3 heures avec ou sans préincubation au lithium. Western blots utilisant l'anticorps anti-tau déphosphorylée Tau-1, l'anticorps anti-tau phospho-indépendant Tau-5 et l'anticorps anti- $\beta$ -actine.

Afin de confirmer l'implication de la déphosphorylation de tau dans son clivage et sa dégradation, les cultures sont exposées à la colchicine. Cette dernière déstabilise le cytosquelette en dépolymérisant les microtubules. La colchicine est aussi connue pour déphosphoryler la protéine tau (Merrick et al, 1996) et induire l'apoptose neuronale (Bonfoco et al, 1995).

Dans un premier temps, nous avons traité les cellules avec la colchicine (1  $\mu$ M) et les avons récoltées à différents temps (1h, 2h, 4h, 6h, 8h et 12h). Les neurones non traités présentent un bon développement du réseau neuritique avec des corps cellulaires normaux. Après 8h de traitement à la colchicine, le corps cellulaire des neurones se rétracte et une destruction du réseau neuritique apparaît ; signes de dégénérescence cellulaire (Figure 47).

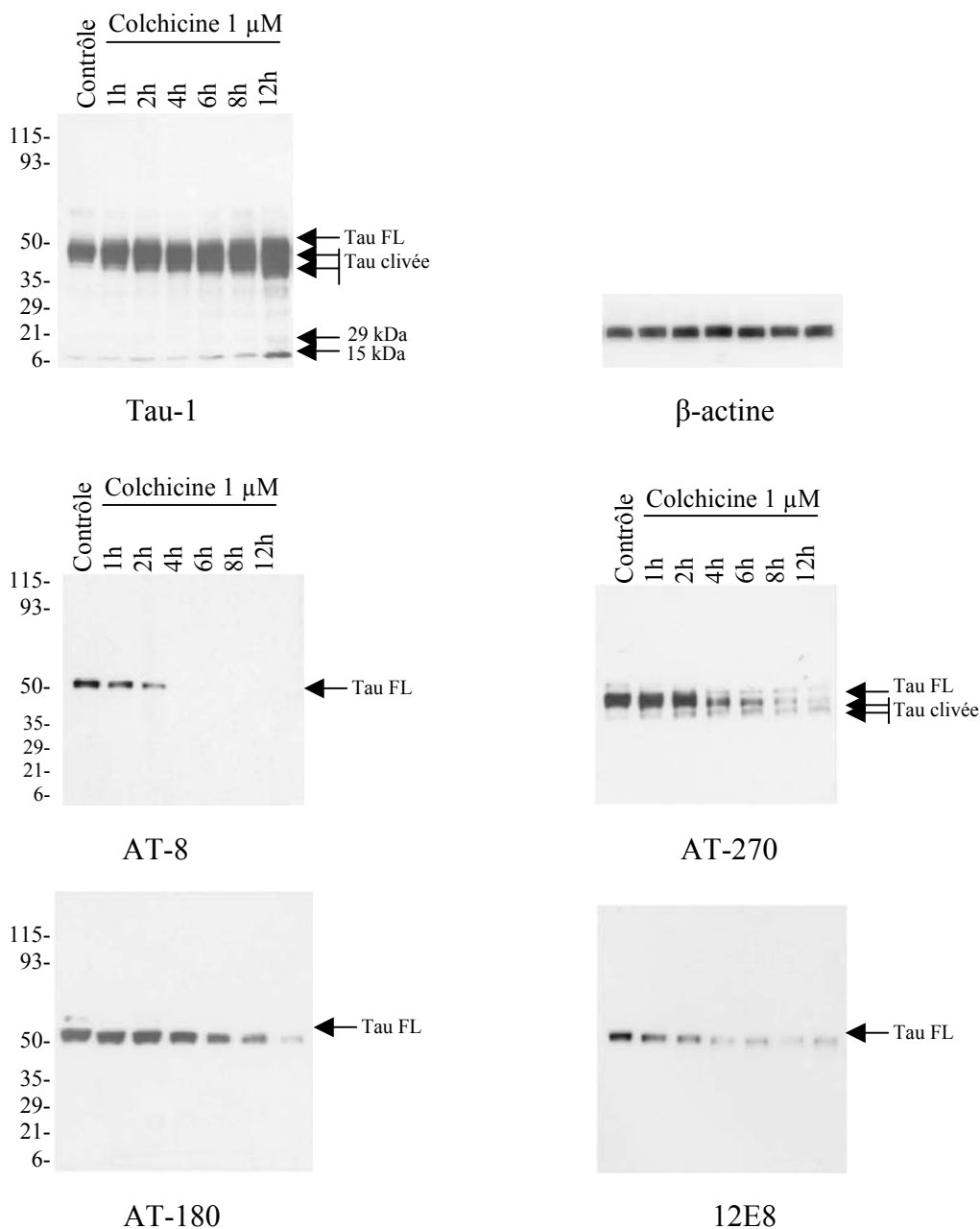
Nous confirmons que la colchicine induit l'apoptose neuronale. Comparés aux neurones dans les cultures contrôles (Figure 47C) où la taille du noyau est normale, les neurones traités par la colchicine (Figure 47D) présentent une fragmentation de la chromatine

(noyaux polylobés), ainsi qu'une réduction de la taille du noyau due à la condensation de la chromatine.



**Figure 47 : Mise en évidence des cellules apoptotiques après traitement à la colchicine.** A-D : culture de neurones corticaux de rat âgées de 7 jours. A,C : culture contrôle. B,D : culture traitée par la colchicine 1  $\mu$ M. Flèches pointues : noyaux polylobés ; flèches triangles : noyaux condensés.

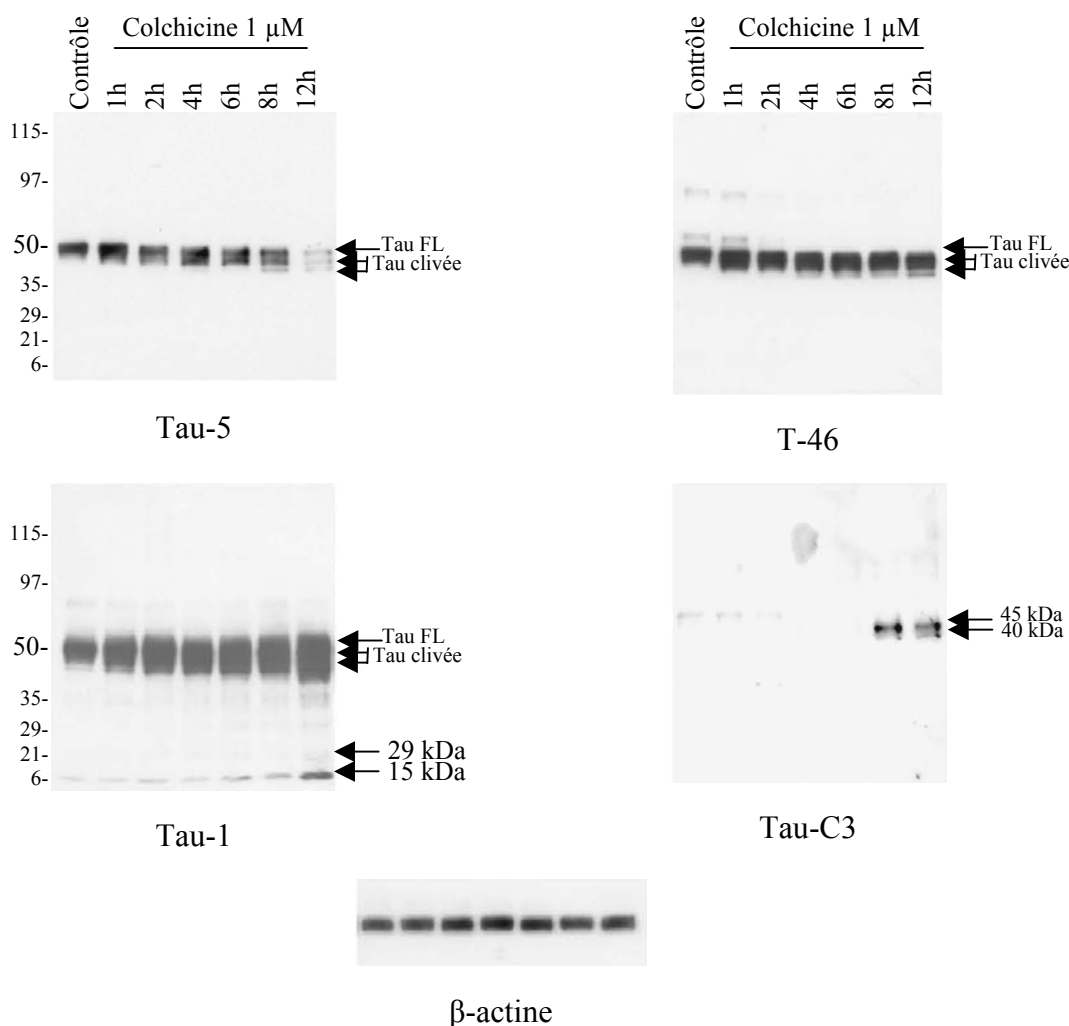
Le western blot utilisant l'anticorps Tau-1 montre que 1  $\mu$ M de colchicine induit la déphosphorylation de tau en fonction du temps (Figure 48). Les western blots utilisant les anticorps anti-tau phosphorylée AT-8, AT-180, AT-270 et 12E8 montrent une diminution des immunoréactivités de tau phosphorylée confirmant ainsi que la colchicine induit une déphosphorylation de tau (Figure 48).



**Figure 48 : Immunoblots de cellules traitées à la colchicine (1  $\mu$ M).** Culture traitée par 1  $\mu$ M de colchicine en fonction du temps. Western blots réalisés avec l'anticorps anti-tau déphosphorylée (Tau-1), les anticorps anti-tau phosphorylée (AT-8, AT-270, AT-180 et 12E8) et l'anticorps anti- $\beta$ -actine.

Comme il a été démontré pour le traitement à la staurosporine, l'exposition à la colchicine pendant 12 heures génère des fragments de tau déphosphorylée de 15 kDa. Cependant, par opposition au traitement réalisé avec la staurosporine, la colchicine induit des niveaux détectables de fragments intermédiaires de protéines tau, incluant un fragment de 50 kDa. Ces fragments sont principalement détectés par les anticorps Tau-1, T-46 et Tau-5.

Tau-C3 détecte deux fragments plus petits que 50 kDa (environ 40 et 45 kDa) après 8 et 12 heures d'exposition à la colchicine (Figure 49).

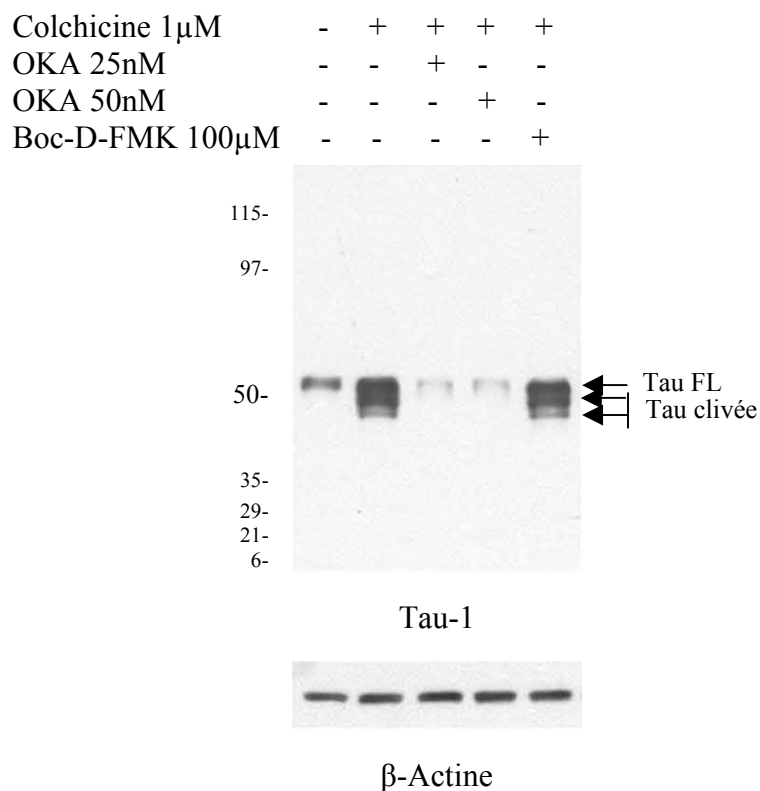


**Figure 49 : Immunoblots de cellules traitées à la colchicine (1μM).** Western blots réalisés avec les anticorps anti-tau phospho-indépendants (T-46 et Tau-5), l'anticorps anti-tau déphosphorylée (Tau-1) et l'anticorps reconnaissant tau clivée (Tau-C3) et l'anticorps anti-β-actine.

Dans un deuxième temps, nous avons traité les cultures avec 1 μM de colchicine pendant 8h. Nous avons cherché à déterminer l'effet de l'état de phosphorylation de la protéine tau sur son clivage ainsi que l'implication des caspases dans ce clivage induit par la colchicine. Pour cela nous avons traité les cultures par la colchicine avec ou sans inhibiteur de la déphosphorylation de la protéine tau (acide okadaïque, OKA) à des concentrations de 25 et 50 nM. L'acide okadaïque est un polyéther d'acide gras qui inhibe les protéines phosphatases 1, 2A et 2C. Nous avons également traité les cultures par la colchicine avec ou sans Boc-D-FMK (inhibiteur des caspases) qui inhibe le clivage de la protéine tau par ces protéases. Les anticorps utilisés sont les mêmes que pour le traitement précédent.



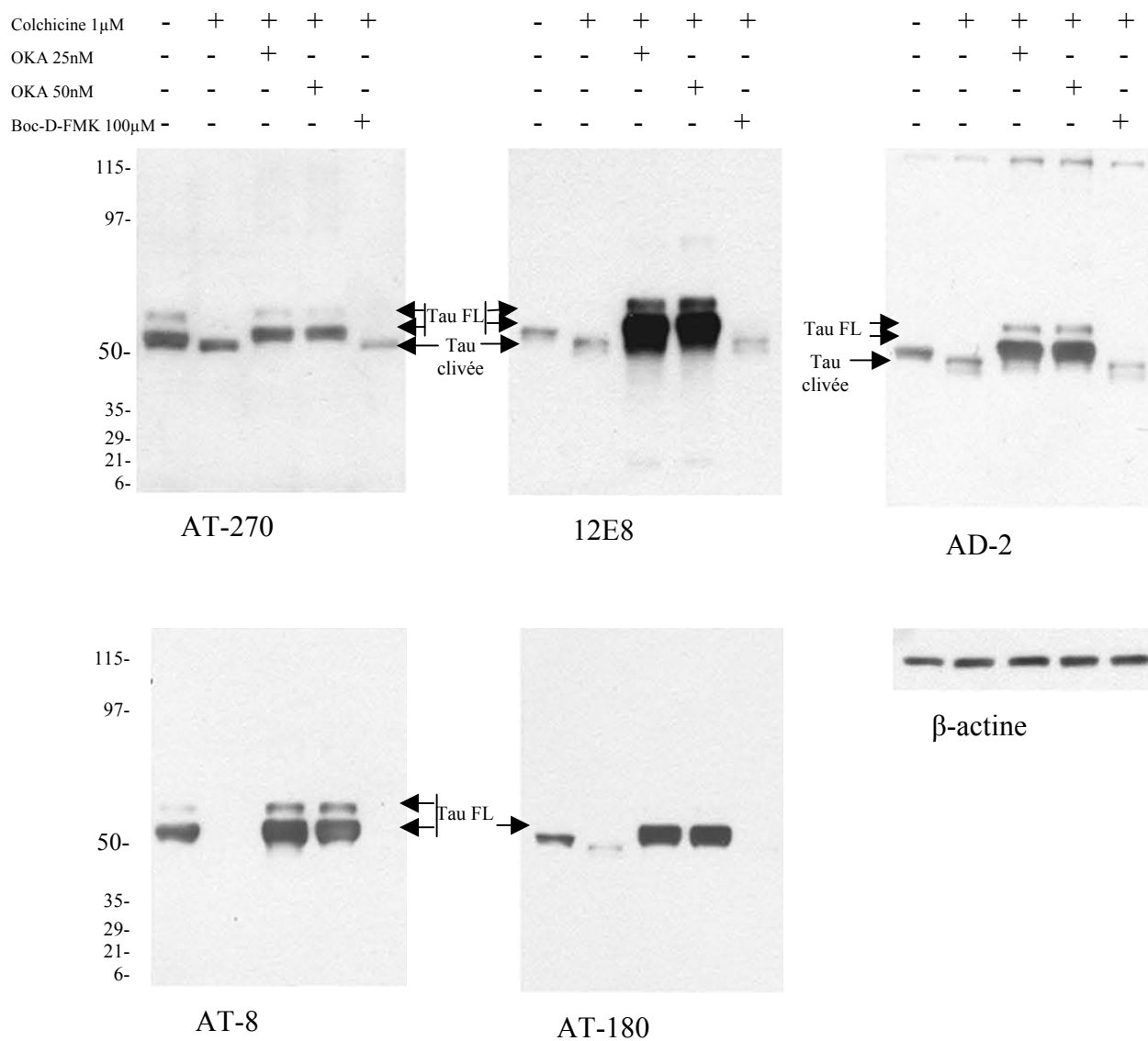
L'inhibition de PP2A par l'OKA (25 et 50 nM) seule augmente tau phosphorylée mais n'induit pas le clivage de la protéine tau. En utilisant l'anticorps Tau-1, nous pouvons voir, comme précédemment, que la colchicine a pour effet d'induire le clivage de la protéine tau déphosphorylée, malgré la présence de Boc-D-FMK (Figure 50). L'inhibition des phosphatases PP1 et PP2A avec l'OKA bloque le clivage de la protéine tau qui est essentiellement hyperphosphorylée.



**Figure 50 : Effets de l'inhibition des phosphatases PP2A par l'OKA et de l'inhibition des caspases par Boc-D-FMK sur la déphosphorylation et le clivage de tau induits par la colchicine.** Western blots réalisés avec l'anticorps anti-tau déphosphorylée (Tau-1) et l'anticorps anti- $\beta$ -actine.

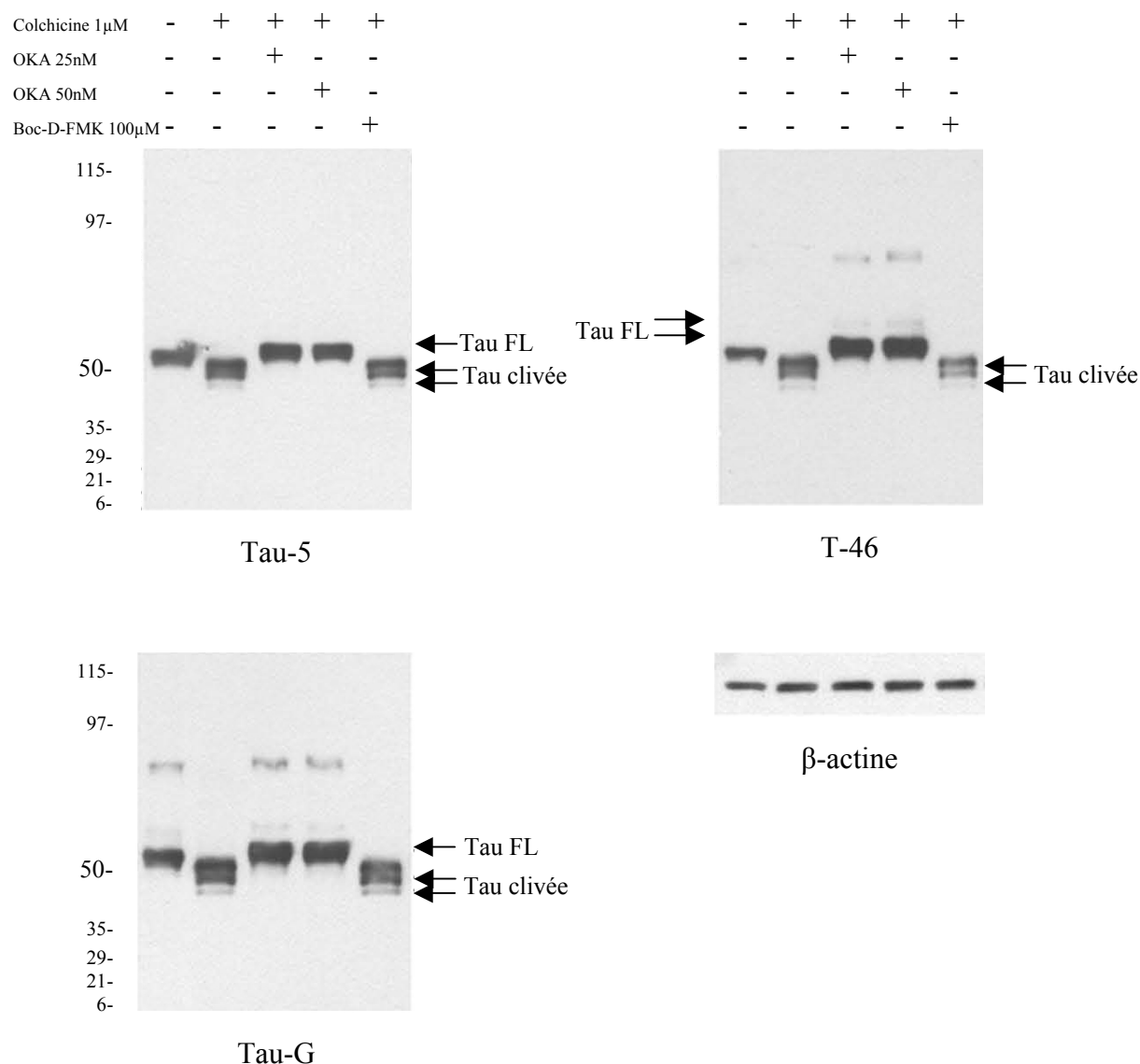
Comme nous l'avons montré précédemment la colchicine diminue la quantité de protéines tau phosphorylées avec les anticorps AT-8, AD-2, 12E8, AT-180 et AT-270 en dépit de l'ajout de Boc-D-FMK. En présence d'OKA une forte concentration en protéines tau phosphorylées est détectée mais aucun clivage n'est observé. Nous constatons la présence de deux bandes pour la protéine tau entière (celle de plus haut poids moléculaire correspondant à un état très phosphorylé de la protéine). L'inhibition de PP2A a donc bloqué la déphosphorylation de tau induite par la colchicine et a augmenté la phosphorylation de tau comme montré par les western blots utilisant l'anticorps anti-tau déphosphorylée, Tau-1 et les

anticorps anti-tau phosphorylée AD-2, 12E8, AT-180, AT-8 et AT-270 (Figure 50, Figure 51).



**Figure 51 : Effets de l'inhibition des phosphatases PP2A par l'OKA et de l'inhibition des caspases par Boc-D-FMK sur la déphosphorylation et le clivage de tau induits par la colchicine.** Western blot utilisant les anticorps anti-tau phosphorylée et l'anticorps anti- $\beta$ -actine.

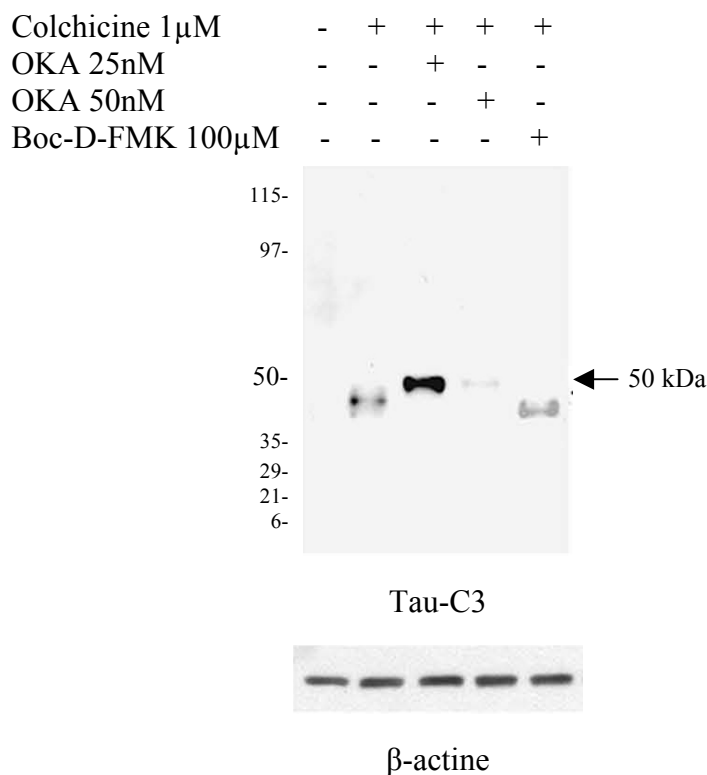
De plus, l'inhibition de PP2A bloque aussi le clivage de tau et restaure la forme entière de tau, comme montré par les western blots utilisant les anticorps dirigés contre la protéine tau totale, T-46, Tau-G et Tau-5 (Figure 52). En contraste à ce qui a été observé dans les cultures exposées à la staurosporine, dans les cultures exposées à la colchicine, l'inhibition des caspases par 100  $\mu$ M de Boc-D-FMK ne restaure pas la forme entière de tau.



**Figure 52 : Effets de l'inhibition des phosphatases PP2A par l'OKA et de l'inhibition des caspases par Boc-D-FMK sur la déphosphorylation et le clivage de tau induits par la colchicine.** Western blots utilisant les anticorps anti-tau phospho-indépendants (Tau-5, T-46 et Tau-G) et l'anticorps anti- $\beta$ -actine.

L'anticorps Tau-C3 ne reconnaît que la protéine tau clivée c'est pourquoi nous ne retrouvons pas de signal dans les cultures contrôles. Un marquage de la protéine tau clivée est observé après traitement par la colchicine et l'OKA. Nous observons également que la colchicine induit un clivage comme précédemment démontré. L'inhibition partielle de PP2A par 25 nM d'OKA mène à l'apparition de fragments de 50 kDa ce qui pourrait correspondre aux formes phosphorylées des fragments de 40 et 45 kDa générés par le traitement à la colchicine (Figure 53). Ceci ne peut pas résulter d'un clivage additionnel de tau dû au traitement avec 25 nM d'OKA, car à cette concentration la forme entière de tau a été restaurée

(voir western blot utilisant l'anticorps Tau-5 par exemple). En outre, une inhibition de PP2A par 50 nM d'OKA empêche presque complètement la formation du fragment de la protéine tau de 50 kDa.



**Figure 53 : Effets de l'inhibition des phosphatases PP2A par OKA et de l'inhibition des caspases par Boc-D-FMK sur la déphosphorylation et le clivage de tau induits par la colchicine.** Western blots utilisant l'anticorps reconnaissant la protéine tau clivée (Tau-C3) et l'anticorps anti-β-actine.

### Résumé de la première partie de notre étude :

Nos résultats montrent que, au cours de l'apoptose neuronale induite par la staurosporine, la protéine tau est tout d'abord hyperphosphorylée, puis déphosphorylée avant d'être clivée et dégradée par les caspases et les calpaïnes. La déphosphorylation et le clivage de tau sont bloqués par l'inhibition de la protéine phosphatase 2A par l'acide okadaïque. Par conséquent, la déphosphorylation est nécessaire et précède le clivage de la protéine tau et sa dégradation. De plus, nous avons montré qu'une déphosphorylation préalable de tau par le lithium, un inhibiteur de la glycogène synthétase kinase-3 $\beta$ , potentialise le clivage de tau.

Nous avons également montré que la protéine tau, suite à une induction de l'apoptose par la colchicine qui déstabilise les microtubules, subit une déphosphorylation par les phosphatases 2A ce qui entraîne un clivage et une dégradation de la protéine tau.

Afin de résumer les travaux de cette première partie de notre étude nous pouvons proposer le schéma suivant :

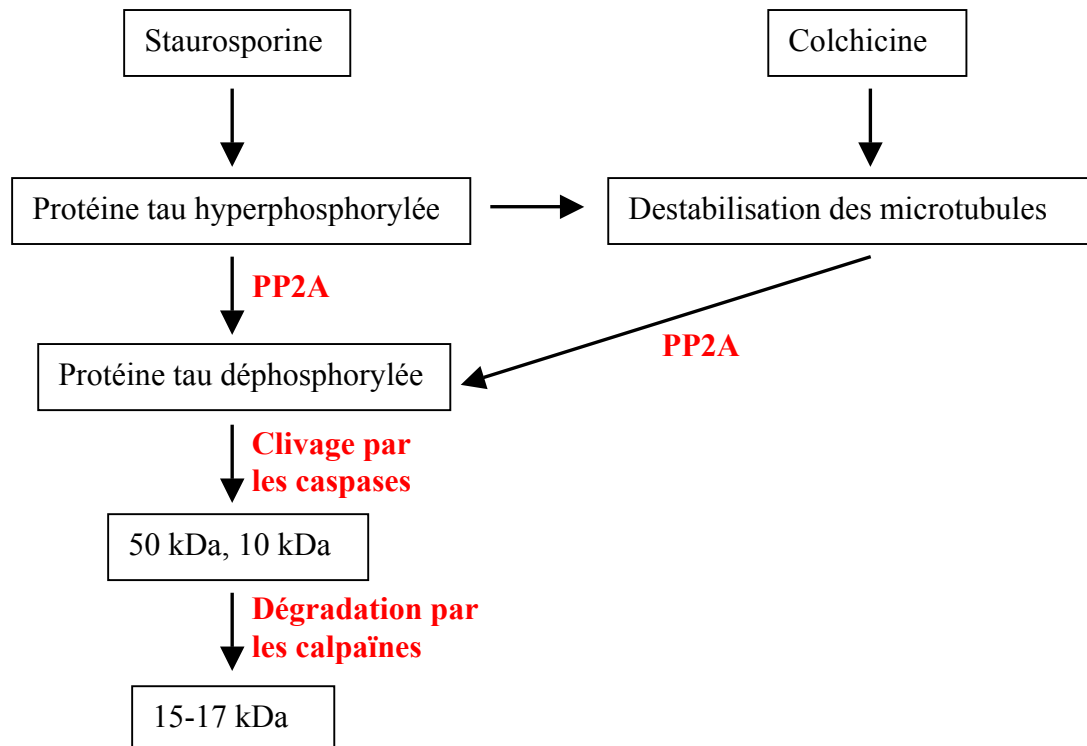


Figure 54 : Schématisation de la séquence des modifications de la protéine tau au cours de l'apoptose.

**PARTIE 2 : LE LITHIUM REGULE NEGATIVEMENT  
L'EXPRESSION DE TAU DANS LES CULTURES DE  
NEURONES CORTICAUX : UN MECANISME  
POSSIBLE DE SON ROLE NEUROPROTECTEUR ?**

Cette deuxième partie fait l'objet d'une publication soumise :

**Lithium down-regulates tau expression in cultured cortical neurons : a possible mechanism of neuroprotection?**

Armelle Rametti, Françoise Esclaire, Catherine Yardin, Nadine Cogné, Faraj Terro.

Dans la première partie de notre étude nous avons montré qu'un traitement par le lithium augmente la déphosphorylation de la protéine tau, potentialise le clivage de tau et diminue également la quantité de protéines tau globale. Ces résultats nous laisse supposer que cette diminution serait due à un clivage protéolytique de tau.

Dans la littérature il a été montré qu'un traitement chronique par du lithium, inhibant la GSK-3 $\beta$ , réduit les lésions tau et la neurodégénérescence chez les souris transgéniques surexprimant les variants humains de tau mutants (Noble et al, 2005 ; Nakashima et al, 2005). Cette réduction serait due à un changement de l'état de phosphorylation de tau.

Cependant, il faut savoir que le mécanisme thérapeutique d'action du lithium n'est pas encore clair, car il y a un grand nombre d'effets biochimiques qui lui sont attribués (Jope, 1999). Par conséquent il pourrait également jouer d'autres rôles que celui de modifier l'état de phosphorylation de la protéine tau par l'intermédiaire de GSK-3 $\beta$ .

Le lithium est depuis longtemps le principal traitement pour soigner les troubles de l'humeur (comme les patients maniaque-dépressifs) (Lenox et Hahn, 2000) mais, des études réalisées à la fois *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le lithium exerce des effets multiples sur les neurotransmetteurs et les récepteurs médiant la signalisation, le transport des ions, les cascades de transduction du signal, la régulation hormonale et circadienne, et altère l'expression des gènes (Jope, 1999 ; Lenox et al, 1998 ; Manji et Lenox, 1998 ; Lenox et Hahn, 2000 ; Williams et Harwood, 2000 ; Manji et Lenox, 2000).

Le lithium est aussi connu pour ses effets neuroprotecteurs contre les agressions cellulaires provoquées par de nombreux produits toxiques (Grimes et Jope, 2001 ; Chuang et al, 2002 ; Jope, 2003). Parmi ceux-ci, il y a mais ce n'est pas une liste exhaustive, le peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ) induisant la mort dans les cellules corticales primaires de rat (Alvarez et al, 1999), la privation de sérum ou de NGF dans les cellules PC12 (Volonte et Rukenstein, 1993), les céramides induisant l'apoptose dans les cellules en grain du cervelet (Centeno et al, 1998), l'excitotoxicité du glutamate dans les cellules en grain du cervelet (Nonaka et al, 1998), la staurosporine et les protéines de choc thermique dans les cellules SH-SY5Y (Bijur et al, 2000).

La capacité de neuroprotection du lithium a conduit de nombreux chercheurs à suggérer la possibilité que l'utilisation thérapeutique du lithium pourrait être étendue des troubles de l'humeur aux troubles neurodégénératifs où le lithium pourrait être capable de retarder la mort neuronale (Grimes et Jope, 2001 ; Tong et al, 2001 ; Li et al, 2000b ; Li et al, 2002). La cible moléculaire du lithium la plus étudiée est la GSK-3 $\beta$ . Elle joue un rôle clé dans la régulation

de la phosphorylation de la protéine tau mais aussi dans la régulation de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine. Suite à l'inhibition de GSK-3 $\beta$  par le lithium, la  $\beta$ -caténine va se transloquer dans le noyau et moduler ainsi l'expression de nombreux gènes (Lenox et Wang, 2003).

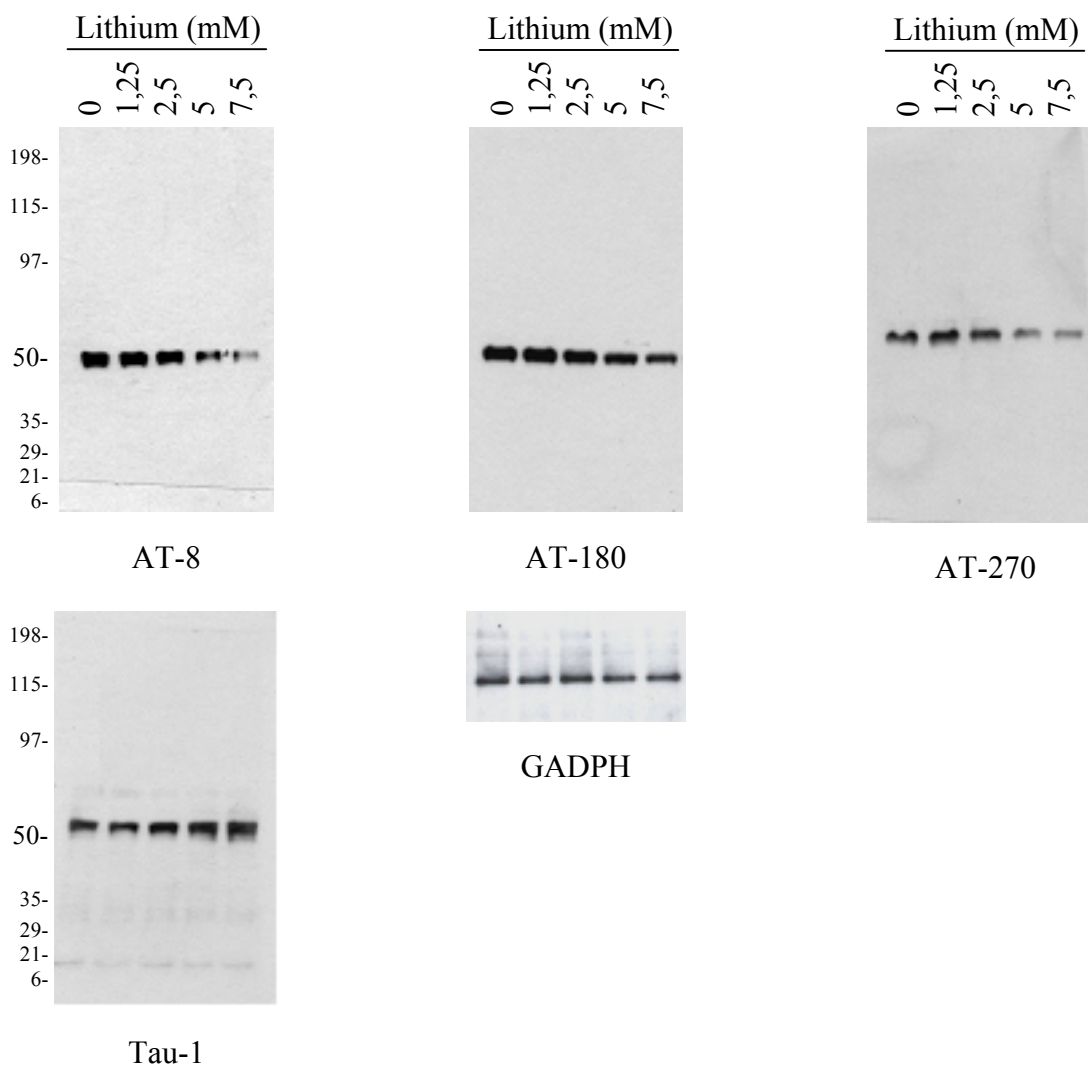
**L'objectif de cette deuxième partie est de comprendre les mécanismes cellulaires entraînant la diminution de la quantité de protéines tau, suite à un traitement par le lithium. Cette diminution est-elle liée à une dégradation protéique ? Quel est son impact sur la cellule ? A-t-elle un effet neuroprotecteur ?**

## **I- Le traitement au lithium induit une diminution du niveau de la protéine tau totale**

De nombreuses études ont montré que le lithium a un effet neuroprotecteur contre une grande variété de stress cellulaires (Volonte et Rukenstein, 1993 ; Nonaka et al, 1998), tels que le peptide A $\beta$  notamment (Alvarez et al, 1999). Une cible potentielle du lithium est la glycogène synthétase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), une importante protéine kinase impliquée dans la phosphorylation de la protéine tau. Des données récentes ont clairement démontré qu'une régulation négative de tau empêche la neurotoxicité *in vitro* induite par le peptide A $\beta$  (Rapoport et al, 2002) et rend réversible la pathologie de tau dans les modèles de tauopathies de souris transgénique (SantaCruz et al, 2005). Nous pouvons nous poser les questions suivantes : est-ce que le lithium peut moduler le niveau de protéines tau ? Est-ce que cette modulation pourrait constituer un mécanisme cellulaire de neuroprotection grâce au lithium ?

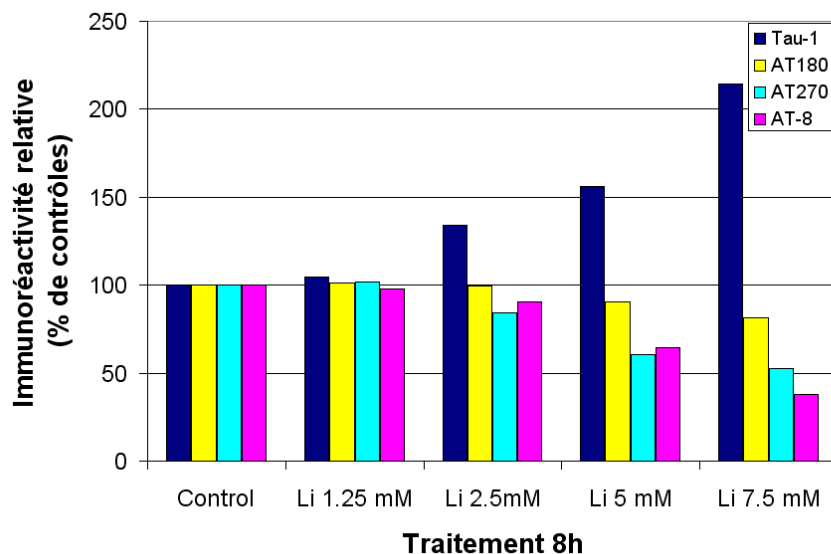
Tout d'abord, nous avons réalisé des expériences dans le but de déterminer les concentrations de lithium capables d'induire la déphosphorylation de la protéine tau et capables d'inhiber efficacement GSK-3 $\beta$ . Pour ce faire, nous avons analysé, par western blot, les épitopes de tau connus pour être phosphorylés par GSK-3 $\beta$ . Dans les immunoblots réalisés avec les anticorps anti-tau phospho-dépendants, après un traitement à des concentrations croissantes de lithium (1,25 à 7,5 mM), le niveau de déphosphorylation de tau augmente (Tau-1) et le niveau de phosphorylation de tau diminue (AT-8, AT-180 et AT-270) (Figure 55). Ces résultats indiquent que les concentrations de lithium que nous avons utilisées inhibent effectivement GSK-3 $\beta$ .





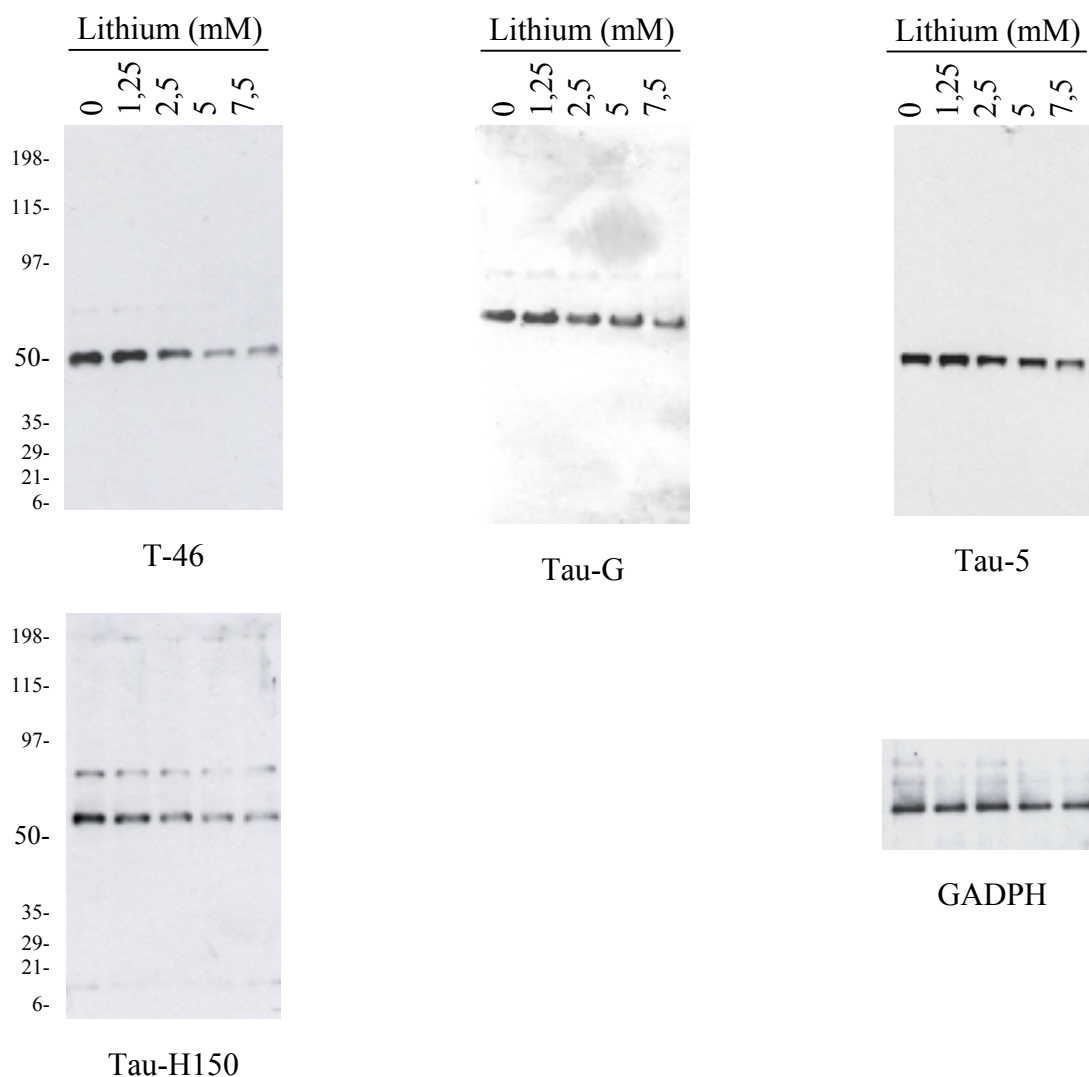
**Figure 55 : Le lithium induit une diminution de la protéine tau totale.** Western blots réalisés avec les anticorps anti-tau phospho-dépendants (AT-8, AT-180, AT-270 et Tau-1) et l'anticorps anti-GADPH.

L'analyse densitométrique des immunoblots précédemment décrits (Figure 55) a été réalisée (Figure 56). Par exemple, pour l'épitope AT-8, la phosphorylation de tau diminue, après un traitement de respectivement 2,5 mM, 5 mM et 7,5 mM de lithium, le pourcentage d'immunoréactivité est de 90,6%, 64,6% et 37,6%. Pour tous les épitopes phosphorylés de tau analysés (AT-180 et AT-270) une diminution de tau phosphorylée a également été observée à partir de 2,5 mM de lithium. Pour l'épitope Tau-1, une augmentation de la déphosphorylation de tau apparaît après un traitement de 2,5 mM de lithium et augmente avec une concentration croissante de lithium.



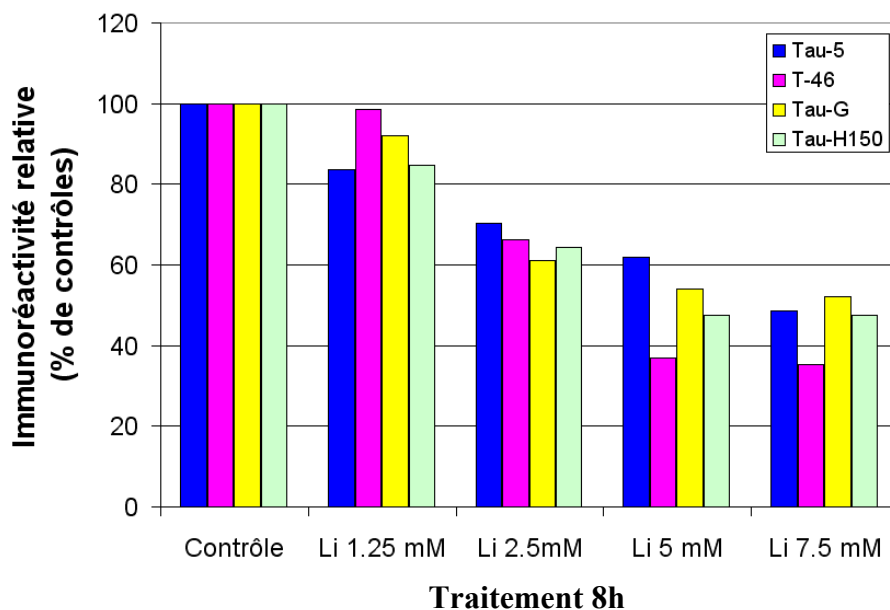
**Figure 56 : Analyse densitométrique des western blots utilisant les anticorps anti-tau phospho-dépendants.** Les immunoréactivités sont exprimées en fonction des pourcentages de contrôles. Les valeurs ont été normalisées par rapport à GADPH.

Ensuite, nous avons réalisé une analyse par western blot de la quantité de protéines totales de tau en utilisant des anticorps anti-tau phospho-indépendants (Figure 57). Ces anticorps sont dirigés contre des épitopes situés dans la partie C-terminale (T-46), dans la partie centrale de tau (Tau-5) et dans la partie N-terminale de tau (Tau-H150). De plus, nous avons aussi utilisé l'anticorps Tau-G qui a été fabriqué en immunisant un lapin par la protéine totale tau. Cette analyse a montré que le lithium induisait une diminution de la quantité de protéines tau totales. Cette diminution débute quand les cultures sont exposées avec 2,5 mM de lithium et continue à diminuer avec des concentrations croissantes de lithium.



**Figure 57 : Le lithium induit une diminution de la protéine tau totale.** Western blots utilisant les anticorps anti-tau phospho-indépendants (T-46, Tau-5, Tau-H150 et Tau-G) et l'anticorps anti- $\beta$ -actine.

L'analyse densitométrique des immunoblots précédemment décrits (Figure 57) a été réalisée (Figure 58). Par exemple, un traitement de 2,5 mM de lithium pendant 8 h, réduit l'immunoréactivité de la quantité totale de tau de 100% (contrôles) à 70,3%, 66,2%, 64,4% et 61,1% comme montré respectivement dans les immunoblots utilisant Tau-5, T-46, Tau-H150 et Tau-G.



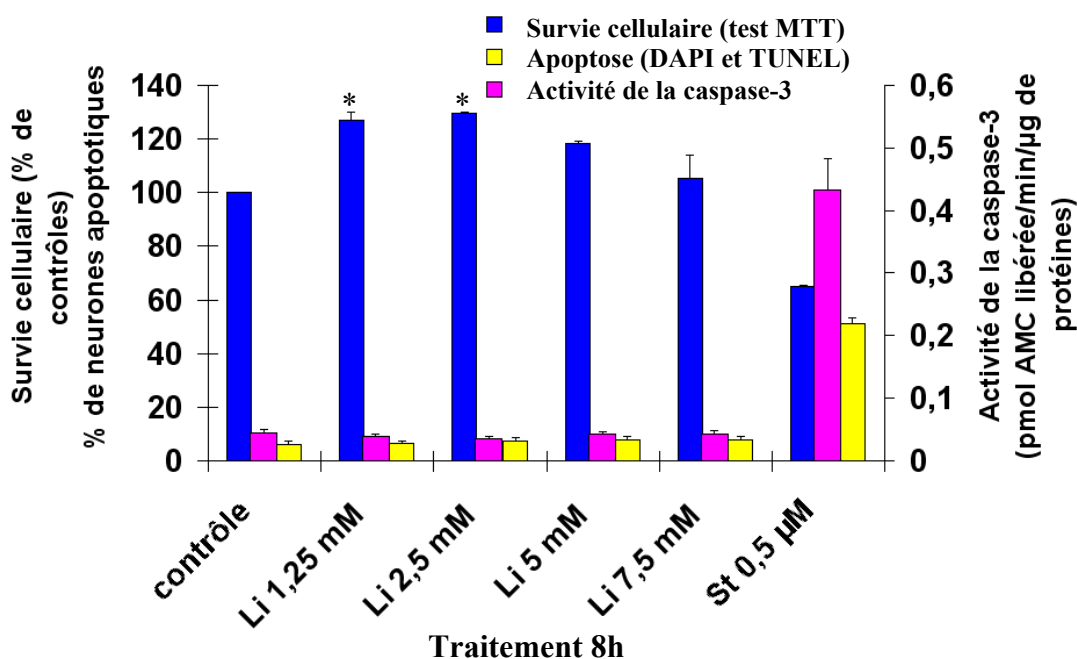
**Figure 58 : Analyse densitométrique des western blots utilisant les anticorps anti-tau phospho-indépendants.** Les immunoréactivités sont exprimées en fonction des pourcentages de contrôles. Les valeurs ont été normalisées par rapport à GADPH.

## **II- La diminution de la protéine tau totale induite par le lithium ne résulte pas d'une perte neuronale**

Quelques mécanismes cellulaires incluant la perte neuronale, la protéolyse et la régulation négative de l'expression du gène de tau pourraient expliquer la diminution de la quantité de protéines tau totales. Nous nous sommes tout d'abord demandés si cette diminution pouvait résulter d'une perte neuronale. En effet, quelques études ont démontré que le lithium pouvait être lui-même cytotoxique pour les cultures de neurones immatures (D'Mello et al, 1994) ou pouvait augmenter la mort neuronale apoptotique induite par le récepteur de mort Fas ou par la staurosporine (Song et al, 2004).

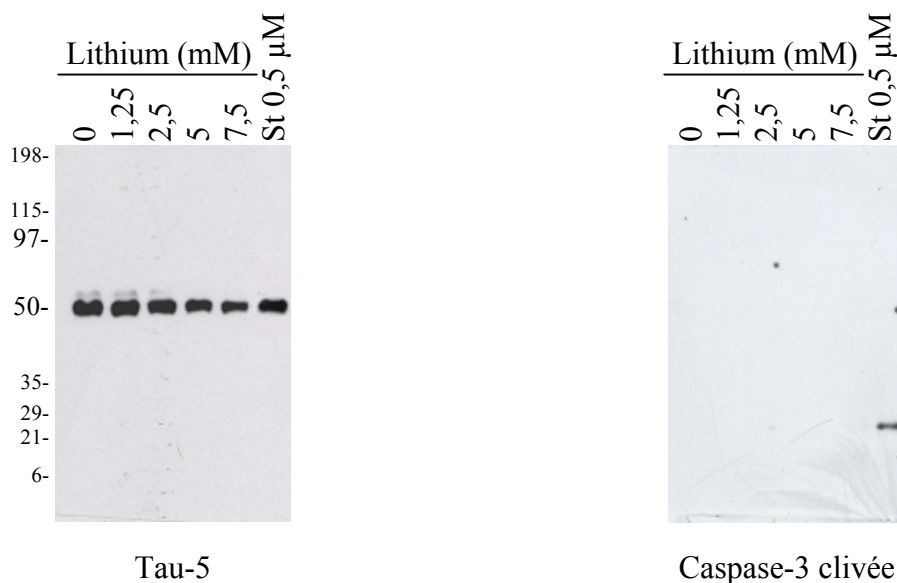
Nous avons évalué par le test MTT la survie cellulaire. Cette expérience montre que le lithium utilisé à des concentrations allant de 1,25 à 7,5 mM ne diminue pas la viabilité cellulaire (Figure 59) en comparaison avec le contrôle. Au contraire, le lithium à des concentrations de 1,25 et 2,5 mM augmente la survie des cellules de respectivement 27% ( $p < 0,05$ ) et 29,5% ( $p < 0,05$ ) ( $*p < 0,5$ , test ANOVA). Ces résultats confirment ceux obtenus par Hashimoto et collaborateurs, en 2003, qui ont démontré que, dans les cultures

hippocampiques de neurones, le lithium induisait une augmentation de la survie cellulaire en stimulant la prolifération des progéniteurs neuronaux. De plus, dans nos conditions expérimentales, l'absence d'effets cytotoxiques du lithium a été confirmée par d'autres procédés expérimentaux souvent utilisés pour détecter l'apoptose : le marquage nucléaire *in situ* par les techniques de DAPI et TUNEL et la mesure de l'activité de la caspase-3.



**Figure 59 : La diminution de la protéine tau ne résulte pas d'une perte neuronale.** Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences (\* $p < 0,5$ ).

Les cultures exposées à des concentrations croissantes de lithium ne montrent pas d'augmentation significative des pourcentages d'apoptose par rapport aux cultures contrôles (Figure 59). Par exemple, le pourcentage de neurones apoptotiques dans les cultures exposées à 2,5 mM de lithium est de 6,7%. Ceci n'est pas significatif par rapport au pourcentage de neurones apoptotiques observé dans les cultures contrôles qui est de 6%. De même, nous n'observons pas par dosage de l'activité de la caspase-3 (Figure 59) et sur le western blot utilisant l'anticorps anti-caspase-3 clivée (Figure 60) d'augmentation significative de l'activité de la caspase-3 ni d'apparition de fragments de la caspase-3.



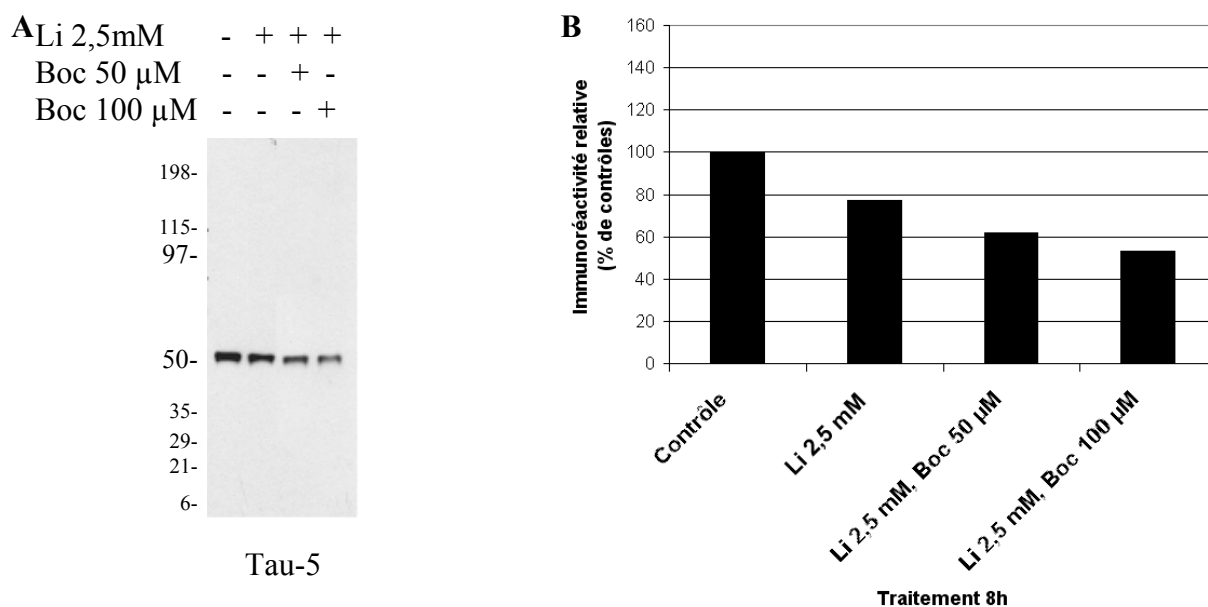
**Figure 60 : La diminution de la protéine tau ne résulte pas d'une perte neuronale.** Western blots utilisant l'anticorps anti-tau phospho-indépendant (Tau-5) et l'anticorps anti-caspase-3 clivée (Caspase-3 clivée). Nos expériences ont été validées en utilisant un contrôle positif (0,5  $\mu$ M de staurosporine, un inducteur de l'apoptose neuronale caspase-dépendante).

### **III- La diminution de la protéine tau totale induite par le lithium n'est pas liée au clivage et à la dégradation par les caspases, les calpaïnes et le protéasome**

Les données que nous avons présentées dans les paragraphes précédents, montrent qu'en dépit de l'utilisation de quelques anticorps anti-tau (dirigés contre les épitopes localisés dans différentes régions de la protéine) dans les western blots, aucun fragment de protéines tau n'a été détecté dans les cultures exposées au lithium (Figure 55, Figure 57). Ces données indiquent que la diminution de la quantité de protéines tau induite par le lithium ne peut-être due à sa dégradation par des protéases. Pour confirmer l'absence de clivage et de dégradation de la protéine tau par des processus protéolytiques lors du traitement au lithium, nous avons étudié l'implication des caspases, des calpaïnes et du protéasome en les inhibant séparément.

Les résultats présentés dans la Figure 60 démontrent clairement que le lithium n'active pas la caspase-3 et ainsi, la diminution de la quantité de protéines tau ne peut pas résulter de sa dégradation par cette caspase. Cependant des résultats antérieurs ont montré que la protéine tau peut-être clivée non seulement par la caspase-3 mais aussi par d'autres caspases comme

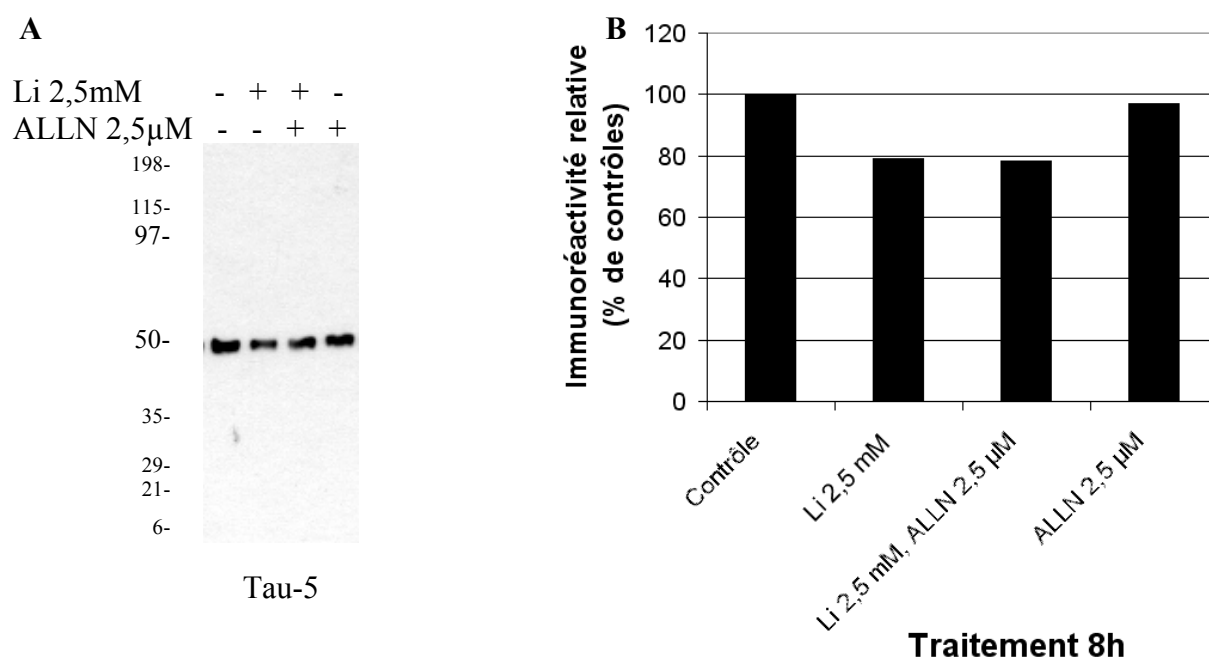
par exemple, la caspase-1, la caspase-2 et la caspase-7 (Gamblin et al, 2003), la caspase-6 (Horowitz et al, 2004) et la caspase-8 (Chung et al, 2003). Toutefois, pour évaluer l'implication de toutes les caspases dans la diminution de la quantité de protéines tau, le traitement au lithium a été réalisé seul ou en présence d'un inhibiteur total des caspases, Boc-D-FMK (50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M) (Figure 61A). L'analyse semi-quantitative de l'immunoblot utilisant l'anticorps anti-tau phospho-indépendant, Tau-5, révèle qu'une exposition à 2,5 mM de lithium seul réduit l'immunoréactivité de tau de 100% (dans les contrôles) à 69%. L'inhibition des caspases par Boc-D-FMK n'empêche pas la diminution de la quantité de protéines tau induite par le lithium ; l'immunoréactivité de tau est respectivement de 61% et de 53% dans les cultures exposées au lithium, en présence de 50 et 100  $\mu$ M de Boc-D-FMK (Figure 61B) ce qui est statistiquement significatif.



**Figure 61 : La diminution de la protéine tau induite par le lithium n'est pas liée à la protéolyse par les caspases.** A-Western blot utilisant l'anticorps anti-tau phospho-indépendant (Tau-5). B-Analyse densitométrique de l'immunoblot Tau-5 normalisé par rapport à l'actine- $\beta$ .

Les calpaïnes sont des protéases calcium-dépendant. Il a été montré qu'elles dégradent la protéine tau dans un système cellulaire ou *in situ* pendant l'apoptose neuronale (Canu et al, 1998 ; Xie et al, 1998). Pour tester leur implication dans la diminution induite par le lithium de la quantité de protéines tau, le traitement des cultures au lithium, a été réalisé en présence ou en absence de l'inhibiteur des calpaïnes, ALLN (Figure 62A). L'analyse semi-quantitative des immunoblots Tau-5 montre que l'exposition à 2,5 mM de lithium seul, diminue

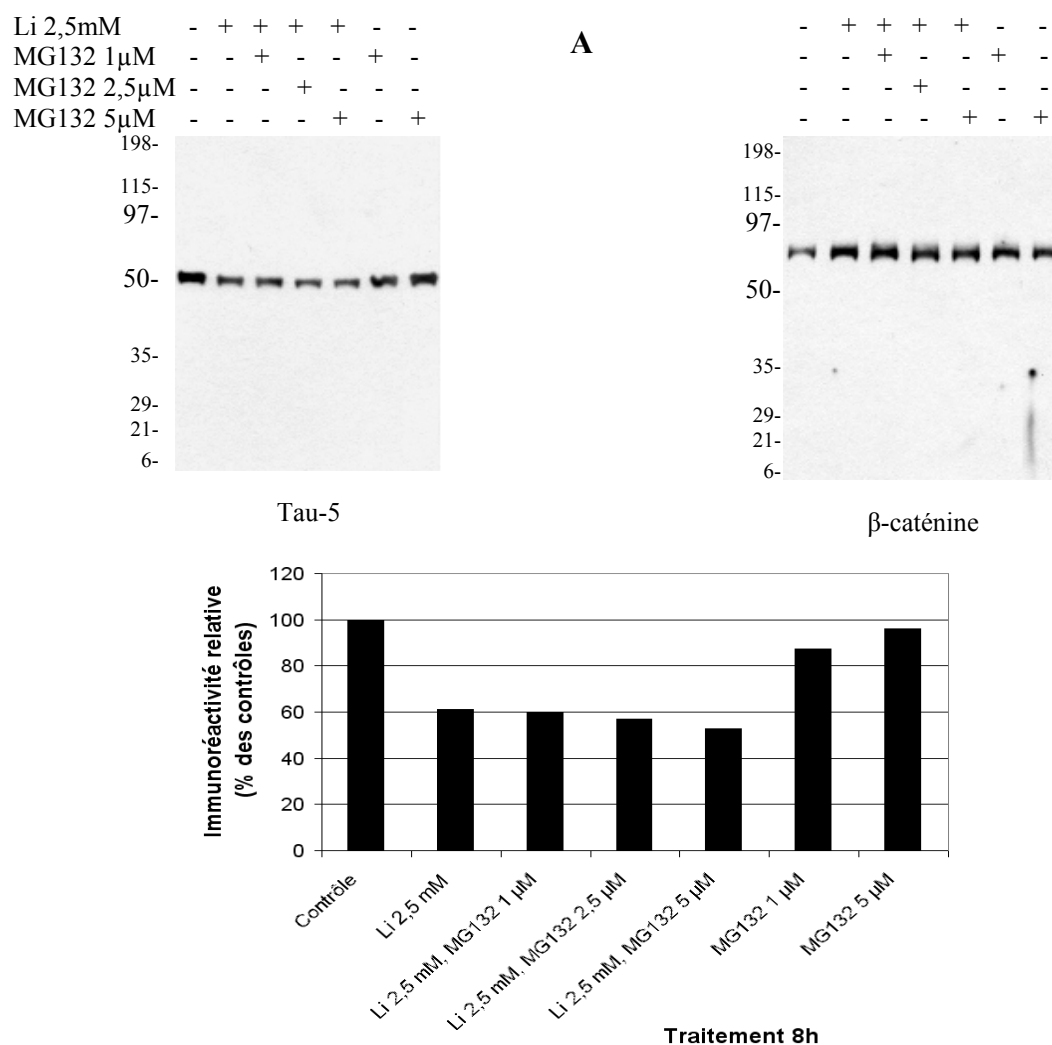
l'immunoréactivité de 100% (dans les contrôles) à 65%. L'inhibition des calpaïnes, avec l'ALLN, ne restaure pas de façon significative la diminution de la quantité de protéines tau induite par le lithium ; l'immunoréactivité de tau étant de 69% dans les cultures exposées au lithium en présence de 2,5  $\mu$ M d'ALLN (Figure 62B).



**Figure 62 : La diminution de la protéine tau induite par le lithium n'est pas liée à la protéolyse par les calpaïnes.** **A**-Western blot utilisant l'anticorps anti-tau phospho-indépendant (Tau-5). **B**-Analyse densitométrique de l'immunoblot Tau-5 normalisé par rapport à l'actine- $\beta$ .

Le système ubiquitine-protéasome est la principale voie extralysosomale impliquée dans la dégradation des protéines mal repliées, endommagées ou en excès. Il a été rapporté que ce système protéolytique joue un rôle dans la régulation de la protéine tau (Petrucci et al, 2004). Nakashima et collaborateurs (2005) ont récemment montré qu'un traitement chronique au lithium, dans les modèles de souris de tauopathies, diminue les lésions tau vraisemblablement en ubiquitinylant la protéine tau. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution de la protéine tau induite par le lithium que nous observons, pourrait résulter d'une activation de l'ubiquitinylation de la protéine tau et de sa dégradation consécutive par le protéasome.





**Figure 63 : La diminution de la protéine tau induite par le lithium n'est pas liée à la protéolyse par le protéasome.** A-Western blots utilisant l'anticorps anti-tau phospho-indépendant (Tau-5) et l'anticorps anti- $\beta$ -caténine. B-Analyse densitométrique de l'immunoblot Tau-5 est normalisé par rapport à l'actine- $\beta$ .

Pour étudier cette hypothèse, le traitement par le lithium a été réalisé en présence ou en absence de concentrations croissantes de l'inhibiteur du protéasome MG132 (1, 2,5 et 5  $\mu$ M). L'efficacité de l'inhibition du protéasome par MG132 a été vérifiée en testant sa capacité à stabiliser la  $\beta$ -caténine. En effet, les immunoblots utilisant l'anticorps anti- $\beta$ -caténine ont montré que l'exposition à MG132 seul induisait une augmentation des niveaux de  $\beta$ -caténine (Figure 63). De façon non surprenante, les immunoblots utilisant l'anticorps anti- $\beta$ -caténine montrent que l'exposition au lithium stabilise la  $\beta$ -caténine. Une analyse semi-quantitative des immunoblots Tau-5 montre que l'exposition à 2,5 mM de lithium seul, diminue l'immunoréactivité de 100% (dans les contrôles) à 61%. L'inhibition du protéasome par des concentrations croissantes de MG132, ne restaure pas la diminution de la quantité de

protéines tau induite par le lithium. L'immunoréactivité est respectivement de 59,6%, 56,8% et 52,7% dans les cultures exposées au lithium en présence de 1, 2,5 et 5  $\mu$ M de MG132.

## **IV- La diminution de la protéine tau induite par le lithium est associée à la diminution de l'ARNm de tau**

L'absence de l'implication des processus protéolytiques nous a conduit à nous intéresser à l'expression du gène de tau.

Des données ont montré que le lithium modulerait (à travers l'inhibition de GSK-3 $\beta$ ) l'activité de quelques facteurs de transcription comme ceux intervenant dans la voie de signalisation Wnt ( $\beta$ -caténine, TCF/LEF) ainsi que l'expression de gènes cibles (Dale, 1998). Ainsi, nous avons examiné la possibilité que la diminution de la protéine tau induite par le lithium, pourrait résulter de la régulation négative de l'expression du gène tau.

Dans ce but, nous avons réalisé une RT-PCR quantitative en utilisant la technologie TaqMan afin de mesurer les différents niveaux d'ARNm de tau après traitement au lithium. Nous avons ainsi utilisé deux sondes TaqMan spécifiques de tau et de GADPH. Les niveaux d'ARNm de tau ont été normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de GADPH (gène ubiquitaire).

Ces résultats montrent une diminution significative des niveaux d'ARNm de tau induite par des concentrations croissantes de lithium (1,25 à 7,5 mM) (Figure 64). La diminution de l'ARNm de tau est corrélée à la diminution de la quantité de protéines tau (Figure 64). L'exposition au lithium diminue le niveau relatif d'ARNm de tau de 100% (contrôles) à 90,3%, 77,8%, 73% et 65% lorsque le lithium est respectivement utilisé à des concentrations de 1,25 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mM.

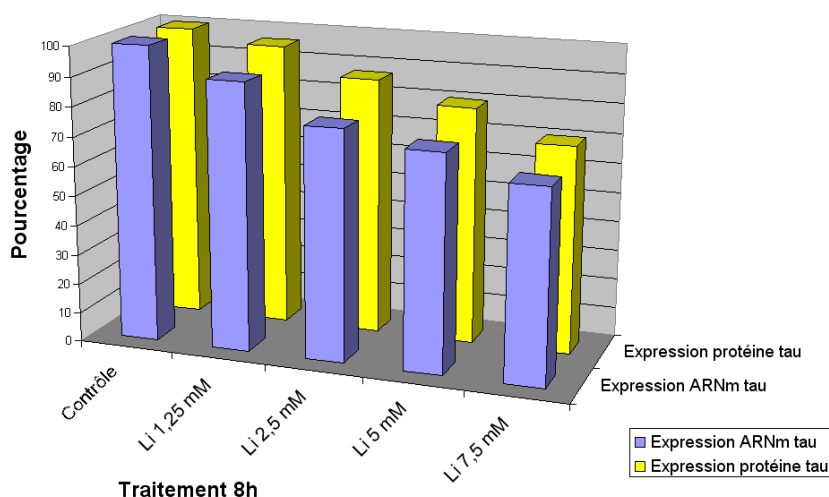


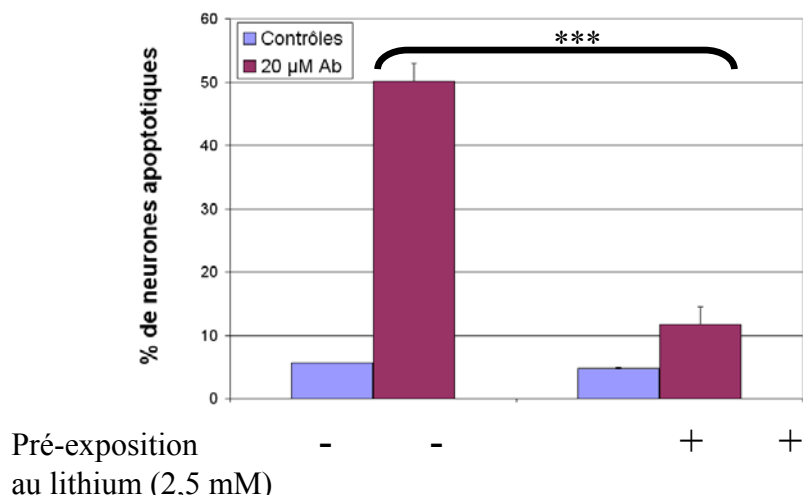
Figure 64 : La diminution de la protéine tau induite par le lithium est associée à la diminution de l'ARNm de tau. RT-PCR quantitative. Normalisation par rapport à GADPH.

## V- Une pré-exposition au lithium confère une neuroprotection face à la neurotoxicité du peptide A $\beta$

De nombreuses études ont montré que le lithium exerce un effet neuroprotecteur contre un grand nombre d'agressions. Ces agressions incluent, par exemple, la mort neuronale induite par le peptide A $\beta$  dans des cellules corticales primaires de rat (Alvarez et al, 1999), la privation de NGF dans les cellules PC12 (Volonte et Rukenstein, 1993) et l'excitotoxicité au glutamate dans les cellules en grain du cervelet (Nonaka et al, 1998). Dans ces conditions, la neuroprotection fournie par le lithium peut être obtenue soit en pré-incubant les cultures avec du lithium (Volonte et Rukenstein, 1993 ; Nonaka et al, 1998) soit en même temps que l'inducteur de mort neuronale (Alvarez et al, 1999).

Dans le but de tester l'hypothèse où la diminution de la quantité de protéines tau induite par le lithium pourrait être associée à une neuroprotection contre la neurotoxicité induite par le peptide A $\beta$ , les cultures ont été incubées avec 2,5 mM de lithium pendant 8h (concentration induisant une diminution de la protéine tau). Après avoir enlevé le lithium, les cultures ont été traitées avec 20  $\mu$ M de peptides A $\beta$  pré-agrégés pendant 24h. L'évaluation de l'apoptose neuronale par un marquage nucléaire au DAPI et par un marquage TUNEL, a montré que

l'exposition des cultures au lithium réduit effectivement l'apoptose neuronale induite par le peptide A $\beta$  de 50% à 13% ( $P < 0,001$ ) (Figure 65).



**Figure 65 : Effet d'une pré-exposition au lithium, sur des neurones corticaux en culture, sur la neurotoxicité de peptides A $\beta$  pré-agrégés.** L'apoptose est mesurée en combinant les marquages au DAPI et au TUNEL. (\*\*\*) $p < 0,001$ .

### Résumé de la seconde partie de notre étude :

Nos résultats montrent que l'exposition des cultures de neurones corticaux au lithium diminue la quantité de protéines tau. Cette diminution n'est pas liée à une perte neuronale ou à l'activation de processus protéolytiques mais à une réduction des ARNm de tau. Nous avons également montré que cette diminution est associée à une résistance des neurones à l'apoptose qui a été induite par le peptide pré-agrégé A $\beta$ .

## **DISCUSSION**

Nous nous sommes intéressés à l'implication de la protéine tau dans la mort neuronale *in vitro*. Plus précisément, la première partie de ce travail avait pour objectif d'étudier les modifications de l'état de phosphorylation de la protéine tau au cours de l'apoptose neuronale et de déterminer l'implication de cet état de phosphorylation sur le clivage de tau et sur l'apoptose. De plus, il a été proposé que l'inhibition de la GSK-3 $\beta$  (enzyme phosphorylant la protéine tau) par le lithium pouvait être un mécanisme de neuroprotection. La seconde partie de ce travail avait pour but de déterminer si le lithium module le niveau de tau et si il est possible que le lithium confère une neuroprotection aux neurones.

Pour cela nous avons utilisé comme modèle biologique des cultures primaires de neurones corticaux de rat car la séquence en acides aminés de la protéine tau de rat présente un haut degré d'homologie avec la séquence humaine. De plus, ce modèle est plus facile à mettre en œuvre que la culture de neurones humains.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont montré que, pour la plupart des phospho-épitopes examinés, la staurosporine induit une augmentation précoce (après 15 minutes d'exposition) et transitoire de la phosphorylation de la protéine tau. L'apparition de ce pic de phosphorylation de tau dépend de l'épitope analysé. Ce pic apparaît après 1h d'exposition à la staurosporine avec l'anticorps AT-8 sur l'épitope Ser<sup>202</sup>/Thr<sup>205</sup> et après 4h avec l'anticorps AD2 sur l'épitope Ser<sup>396</sup>/Ser<sup>404</sup>. Ces données indiquent que des interactions pourraient exister entre les différents épitopes de phosphorylation de la protéine tau ; la phosphorylation d'un épitope faciliterait celle d'autres épitopes.

Nos observations sont, en partie, en accord avec celles rapportées en 2000 par Zang et collaborateurs dans les cellules PC12 privées de NGF. Dans cette étude, l'augmentation de la phosphorylation de la protéine tau a été observée pour les épitopes reconnus par les anticorps 12E8, AT-8/Tau-1 et PHF-1, tandis que la phosphorylation détectée par l'anticorps AT-270 sur l'épitope Thr<sup>181</sup> est restée inchangée. A l'opposé, dans notre modèle de culture primaire de neurones corticaux exposés à la staurosporine, la phosphorylation de la protéine tau augmente pour l'anticorps AT-270 et diminue pour l'anticorps 12E8 reconnaissant l'épitope Ser<sup>262</sup>/Ser<sup>356</sup>. Ces divergences pourraient être dues aux différents modèles de culture et agents inducteurs d'apoptose utilisés. La sérine 356 est située dans le domaine de liaison aux microtubules, et sa phosphorylation ne réduit que légèrement la liaison de tau aux microtubules (Boix et al, 1997 ; Seubert et al, 1995). Dans notre étude, la staurosporine

diminue la liaison de tau aux microtubules et réduit la phosphorylation de tau sur les sérines 262 et 356. Si nous considérons que la diminution de la liaison de la protéine tau aux microtubules (due à sa phosphorylation) est un événement clé dans notre modèle d'apoptose, l'implication de la phosphorylation de tau sur les sérines 262 et 356 dans l'apoptose neuronale peut alors être exclue puisque nous voyons une diminution de la phosphorylation sur ces sérines.

Deux équipes, en 2001 et 2003, ont démontré qu'un clivage de tau apparaît au cours de l'apoptose neuronale induite dans des cultures de neurones (Chung et al, 2001 ; Gamblin et al, 2003 ). En utilisant un système acellulaire, ces auteurs ont aussi démontré que la protéine tau recombinante pouvait être clivée par la caspase-3 sur l'aspartate 421. Ce clivage mène à un fragment de 50 kDa qui comprend les résidus 1 à 421. Ces deux études ont montré que l'anticorps Tau-5 détecte un fragment de 50 kDa. Cet anticorps reconnaît les résidus 210-230 de la protéine tau indépendamment de son état de phosphorylation. Ce fragment a aussi été détecté spécifiquement par l'anticorps Tau-C3, un anticorps monoclonal dirigé contre les résidus 412-421 (Gamblin et al, 2003). Dans notre étude, quand l'extraction protéique a été réalisée avec le tampon de Laemmli modifié, les anticorps anti-tau phosphorylée et l'anticorps Tau-5 sont seulement parvenus à détecter un très faible niveau de fragments de protéines tau (45 et 50 kDa) au cours de l'apoptose induite par la staurosporine contrairement aux résultats obtenus par Chung et collaborateurs ainsi que par Gamblin et collaborateurs. Toutefois, l'anticorps anti-tau déphosphorylée Tau-1 et l'anticorps anti-tau clivée Tau-C3 ont détecté des fragments de protéines tau. En plus du fragment de 50 kDa observé par Gamblin et collaborateurs, l'anticorps Tau-C3 a détecté un fragment de 10 kDa. Des expériences supplémentaires nous ont permis d'expliquer ces divergences et ont montré que, suivant le tampon d'extraction utilisé, un fragment de 50 kDa en plus ou moins grande quantité pouvait être détecté dans des cultures exposées à la staurosporine par les anticorps Tau-C3 et Tau-5. De plus, nous avons démontré que le fait d'introduire un inhibiteur des caspases, Boc-D-FMK, dans le tampon utilisé pour réaliser le fractionnement de tau (séparation des fractions libre et liée de tau) provoque une diminution de la quantité de fragment de 50 kDa. Ces données suggèrent que le fragment de protéine tau de 50 kDa détecté en grande quantité dans les études de Gamblin et collaborateurs et de Chung et collaborateurs pourrait être généré de façon « artificielle » au cours du protocole d'extraction. Il nous semble donc important

d'inhiber les caspases au cours de nos extractions protéiques afin d'éviter une surestimation du clivage de la protéine tau.

Mis à part ces problèmes techniques, il demeure que, dans notre modèle, le marquage de la protéine tau clivée par western blot révèle une faible quantité de fragment de 50 kDa. En fait, lorsque l'on effectue une inhibition partielle des caspases par Boc-D-FMK dans nos cultures, le fragment de 10 kDa n'est plus généré et la quantité de fragment de 50 kDa est augmentée. Ceci indique indirectement que le fragment de 50 kDa était généré dans notre modèle et cela pourrait expliquer les différences entre nos résultats et ceux de Chung et collaborateurs ainsi que ceux de Gamblin et collaborateurs. On peut supposer que le fragment de 50 kDa est resté à un faible niveau car il est rapidement dégradé en de plus petits fragments, principalement de 10 et 15 kDa. Ces résultats suggèrent que le fragment de 50 kDa peut s'accumuler dans les cellules en train de mourir dès que les systèmes protéolytiques responsables de sa dégradation sont dépassés ou ne fonctionnent plus.

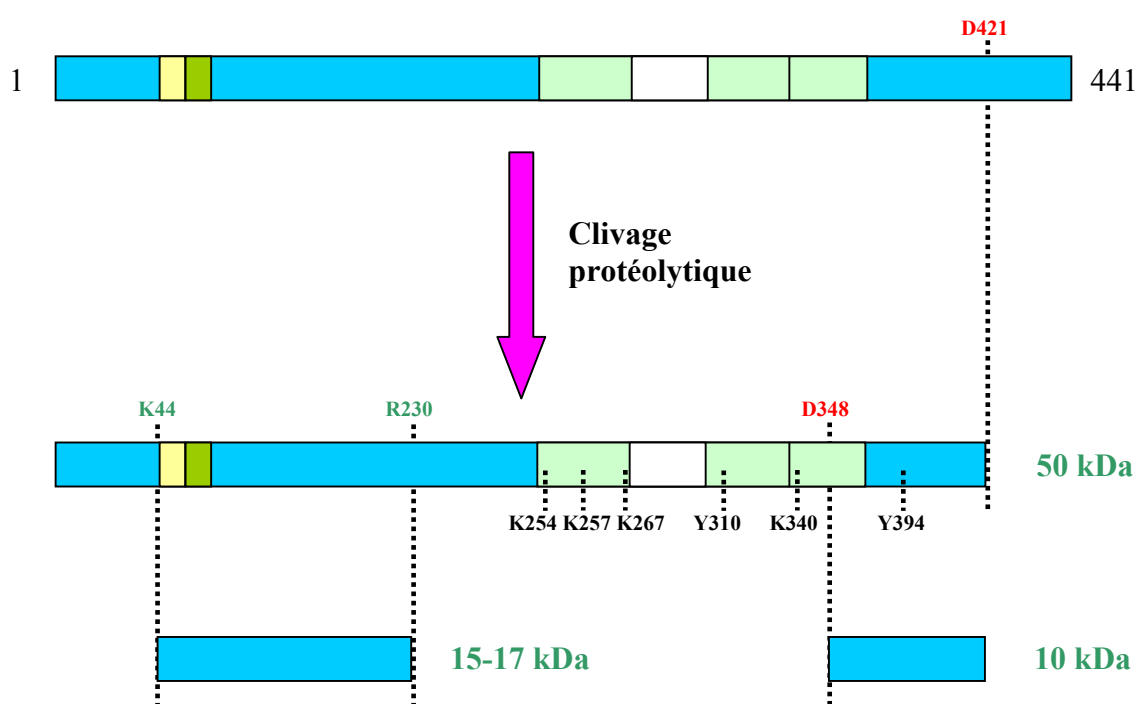
La protéine tau possède au moins deux sites putatifs de clivage par les caspases situés au niveau des térapeptides <sup>345</sup>DFKD<sup>348</sup> et <sup>418</sup>DMVD<sup>421</sup>. Chung et collaborateurs (2001) ainsi que Gamblin et collaborateurs (2003) ont montré que les caspases ne clivent la protéine tau que sur l'Asp<sup>421</sup> menant au fragment de 50 kDa. Dans notre étude, le fragment de 10 kDa détecté par l'anticorps Tau-C3 pourrait résulter d'un clivage supplémentaire sur l'Asp<sup>348</sup>. Ce clivage générerait un fragment comprenant les résidus 349-421 (soit 73 acides aminés) et ayant un poids moléculaire estimé à environ 8,8 kDa, ce qui pourrait correspondre au fragment de 10 kDa observé dans les western blots. Ces données suggèrent que dans les cultures de neurones, les caspases clivent la protéine tau non seulement sur l'Asp<sup>421</sup> mais aussi probablement sur l'Asp<sup>348</sup>.

En plus des deux sites putatifs de clivage par les caspases sur la protéine tau, il existe de nombreux sites putatifs de clivage par les calpaïnes (Canu et al, 1998). Dans des systèmes acellulaires et dans des situations de stress cellulaire, il a été montré que les calpaïnes dégradent la protéine tau (Canu et al, 1998 ; Xie et Johnson, 1998). Dans notre étude, l'inhibition des calpaïnes empêche la formation du produit final de clivage de 15-17 kDa. On observe une accumulation du fragment de 50 kDa, cependant la forme entière de la protéine n'est pas restaurée. Les calpaïnes doivent donc agir en clivant le fragment de 50 kDa (obtenu



après clivage par les caspases) au niveau de deux sites putatifs de clivage situés sur la Lys<sup>44</sup> et l'Arg<sup>230</sup>, pour donner le fragment de 15-17 kDa. Canu et collaborateurs (1998) ont montré qu'il existe également d'autres sites putatifs de clivage par les calpaïnes au niveau des Lysines 254, 257, 267, 340, et des Tyrosines 310 et 394. Cela explique qu'en cas d'inhibition nous retrouvons dans notre étude de nombreuses formes intermédiaires de clivage, ainsi qu'une accumulation du fragment de 50 kDa (Figure 66).

D'après nos résultats, il est possible de supposer que le clivage de la protéine tau se fait suivant le schéma ci-dessous :



**Figure 66 : Fragments générés après clivage au niveau des sites potentiels de clivage par les caspases et les calpaïnes.** Les deux sites putatifs de clivage par les caspases générant les fragments de 50 et 10 kDa sont en rouge. Les deux sites putatifs de clivage par les calpaïnes générant le fragment de 15-17 kDa sont en vert et les autres sites putatifs de clivage sont en noir.

Nous avons démontré que l'inhibition totale des caspases restaure la forme entière de la protéine tau mais elle est toujours déphosphorylée. Ceci se confirme lorsque l'on examine les neurones individuellement en immunocytochimie : dans les neurones traités par la staurosporine et l'inhibiteur des caspases (Boc-D-FMK) nous observons un fort immunomarquage de la protéine tau déphosphorylée dans les corps cellulaires et dans les prolongements neuronaux. Ces résultats indiquent clairement que l'inhibition des caspases

bloque le clivage de la protéine tau et que la déphosphorylation de tau survient avant son clivage et sa dégradation.

Dans notre modèle expérimental, nous avons montré qu'au cours de l'apoptose neuronale la phosphorylation précédait la déphosphorylation de tau et que cette déphosphorylation est nécessaire pour le clivage et la dégradation de la protéine tau car :

1°) Les anticorps anti-tau phosphorylée n'ont pas détecté de façon significative la protéine tau fragmentée après une exposition des cultures à la staurosporine ou à la colchicine.

2°) Normalement dans les cultures exposées à la staurosporine, si les caspases clivent la protéine tau phosphorylée, alors leur inhibition devrait restaurer la forme entière de tau phosphorylée. Or, cela n'a pas été clairement le cas, au contraire, l'inhibition des caspases a restauré la forme entière de protéine tau déphosphorylée.

3°) Une déphosphorylation préalable de la protéine tau par le lithium potentialise le clivage de tau et l'apoptose induite par la staurosporine.

4°) La colchicine induit la déphosphorylation de la protéine tau ainsi que son clivage et sa dégradation. Ces deux derniers phénomènes ont été empêchés par l'inhibition de la PP2A.

**Pour ces raisons nous pouvons conclure que la protéine tau doit être déphosphorylée pour être clivée et dégradée.**

Notre étude n'a pas permis de déterminer si les modifications de phosphorylation de la protéine tau sont directement impliquées dans le clivage de tau au cours de l'apoptose neuronale. Les effets de l'inhibition de PP2A sur le clivage de la protéine tau n'ont pas été testés lorsque l'apoptose et le clivage de tau sont induits par la staurosporine, car l'inhibition de PP2A et le traitement par la staurosporine (lors des étapes précoces de l'apoptose) mènent à l'augmentation de la phosphorylation de la protéine tau. L'utilisation concomitante de ces deux substances devrait mener à l'augmentation de l'apoptose. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si la phosphorylation ou la déphosphorylation de la protéine tau modifient directement son clivage et sa dégradation dans un système acellulaire.

L'inhibition de PP2A augmente la quantité de protéine tau phosphorylée sur tous les phospho-épitopes analysés. La séquence de phosphorylation des épitopes directement

impliqués dans le clivage réalisé par les caspases et la dégradation ultérieure doit être déterminée. De plus, il a été démontré précédemment que la sérine 422, située immédiatement après le site de clivage par les caspases  $^{418}\text{DMVD}^{421}$ , subit une phosphorylation suite à un traitement par l'acide okadaïque (inhibiteur des phosphatases) sur des lignées neuronales (Caillet-Boudin et Delacourte, 1996). Or le blocage du clivage par phosphorylation des résidus situés à proximité des sites de clivage a été rapporté pour la PARP qui est le substrat le plus étudié de la caspase-3 (Tozser et al, 2003). Nous pouvons supposer qu'un mécanisme similaire pourrait exister et que la phosphorylation de la sérine 422 diminuerait ou bloquerait le clivage de la protéine tau par les caspases. Pour valider cette hypothèse, des expériences de mutagenèse dirigée sur le site de phosphorylation de la sérine 422 de la protéine tau voire sur d'autres sites à proximité devront être réalisées.

Nous avons montré dans notre étude que l'inhibition de PP2A empêche la déphosphorylation de tau ainsi que son clivage et sa dégradation lorsqu'ils sont induits par la colchicine. Ces résultats obtenus dans notre modèle expérimental sont à rapprocher des observations réalisées par Trojanowski et Lee. Ils ont observé dans les cerveaux alzheimeriens une diminution de l'activité des PP2A et ils ont suggéré que cette diminution d'activité pourrait contribuer à l'accumulation de la protéine tau fortement phosphorylée dans les PHF (Trojanowski et Lee, 1995). De plus Hall a montré qu'en injectant des PHF (extraits par biopsie de cerveaux de patients alzheimeriens) dans des neurones du système nerveux central du ver *C. elegans*, une déphosphorylation apparaît immédiatement tandis qu'une protéolyse de tau n'est totale qu'après deux jours. Dans ce modèle, la déphosphorylation précède donc la dégradation intracellulaire de tau et Hall a suggéré que l'accumulation des tau-PHF pourrait être due à un mauvais fonctionnement des mécanismes normaux de déphosphorylation et de protéolyse de tau (Hall, 1999).

La protéine tau est hyperphosphorylée au cours du développement fœtal du cerveau (Mawal-Dewan et al, 1994), dans le cerveau adulte en réponse à de nombreuses agressions (pour revue Yen et al, 1995) et dans des conditions pathologiques telles que la maladie d'Alzheimer (Lee et al, 1991). La protéine tau, dans sa forme hyperphosphorylée, est le principal composant des PHF observées dans la MA (Greenberg et al, 1992 ; Seargent et al, 1997). Au cours du développement fœtal du cerveau, l'hyperphosphorylation de tau joue un rôle important dans la neurogenèse où de grandes quantités de protéines tau sont nécessaires.

L'hyperphosphorylation de tau pourrait protéger la protéine tau de la protéolyse et de ce fait, augmenterait la quantité de protéine tau disponible nécessaire pour la neurogenèse. L'hyperphosphorylation de tau diminue sa capacité de liaison aux microtubules. Il est possible que, au cours du développement du cerveau, la protéine tau soit déphosphorylée au moins sur les épitopes impliqués dans cette interaction lui permettant ainsi de se lier aux microtubules. Les quantités de protéine tau déphosphorylée doivent correspondre à celles des microtubules disponibles. Un excès de protéine tau déphosphorylée (par rapport aux microtubules) provoquerait une accumulation de celle-ci dans les neurones. Cette accumulation peut être obtenue de façon expérimentale en exposant des cultures de neurones au lithium. La protéine tau déphosphorylée en elle-même n'est pas délétère pour les neurones. Cependant, comme nous l'avons montré, en présence d'un inducteur d'apoptose, la déphosphorylation de la protéine tau augmente facilitant son clivage et sa dégradation et accélère ainsi l'apoptose.

Dans les cerveaux d'animaux adultes, l'hyperphosphorylation de la protéine tau semble être une adaptation aux changements de conditions environnementales. En effet, Arendt et collaborateurs ont récemment montré en 2003 qu'au cours de l'hibernation, une hyperphosphorylation de tau apparaît sur des épitopes de cette protéine identiques à ceux impliqués dans la formation des tau-PHF. Cette phosphorylation des tau-PHF est entièrement réversible après le réveil. Ces auteurs ont suggéré que la formation répétée des tau-PHF pourrait représenter un mécanisme physiologique qui ne serait donc pas nécessairement associé à des circonstances pathologiques. A l'opposé, dans les cerveaux de patients alzheimeriens, l'hyperphosphorylation de la protéine tau semble irréversible et contribue à la formation des PHF (Arendt et al, 2003). Ainsi, la diminution de l'activité des PP2A observée dans les cerveaux alzheimeriens (Trojanowski et Lee, 1995) pourrait contribuer à l'accumulation de protéine tau fortement phosphorylée dans les PHF : cette accumulation ne serait pas seulement la conséquence de l'hyperphosphorylation mais également de l'inhibition du clivage et de la dégradation dans les neurones en dégénérescence.

**En conclusion, la déphosphorylation joue un rôle crucial non seulement en facilitant la liaison de la protéine tau aux microtubules au cours du développement du cerveau et dans la plasticité neuronale, mais aussi en contribuant à l'élimination de la protéine tau phosphorylée observée dans les neurones pour empêcher la formation des PHF.**

La séquence des différentes modifications subies par la protéine tau après induction de l'apoptose peut être synthétisée de la façon suivante :

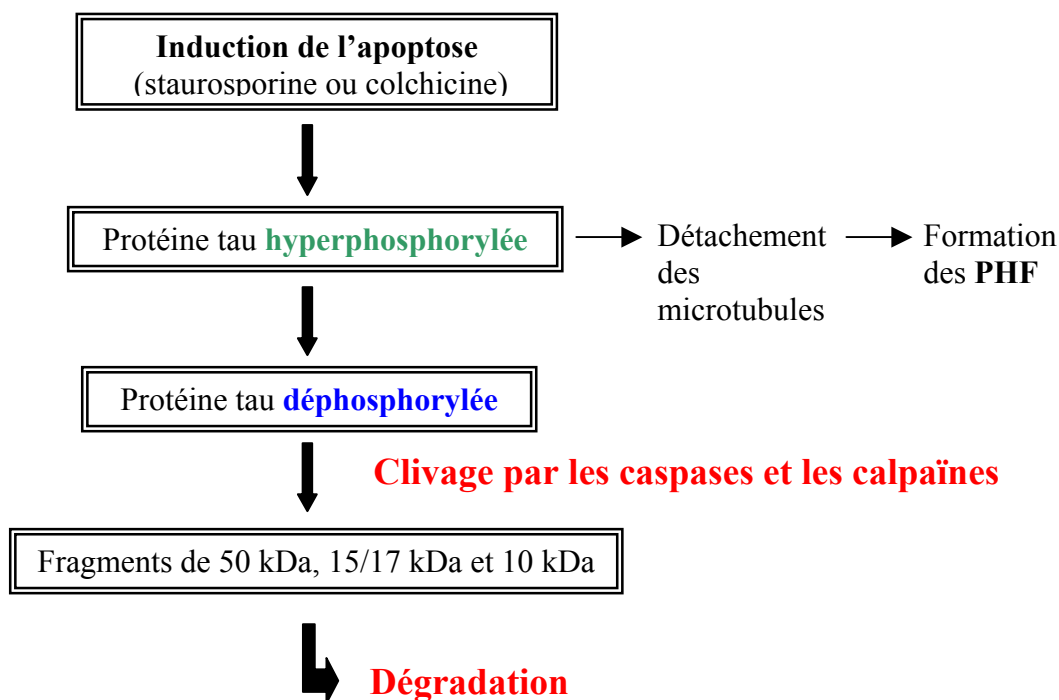


Figure 67 : Séquence des modifications de la protéine tau au cours de l'apoptose.

L'association entre les lésions tau, la perte neuronale, et le dysfonctionnement du cerveau chez l'homme et la souris ont fait supposer que les lésions tau provoquaient invariablement un dysfonctionnement du cerveau et la neurodégénérescence. Cependant des données récentes remettent en question cette hypothèse. En effet, Santa Cruz et collaborateurs (2005) ont utilisé des modèles de souris transgéniques exprimant un variant de tau humain porteur de la mutation P301L (associée à une tauopathie humaine) susceptible d'être réprimé expérimentalement par l'administration d'antibiotiques. Ces auteurs démontrent que les souris développent des troubles mnésiques et un nombre de lésions tau directement corrélé au niveau d'expression de variants tau P301L ainsi qu'à l'âge des souris. Lorsque l'expression du variant de transgénique est réprimée, on assiste à une récupération des capacités mnésiques et à une stabilisation du nombre de neurones dans le cerveau des souris alors que les DNF continuent à s'accumuler. Par conséquent, les DNF ne seraient pas suffisantes pour provoquer le déclin cognitif et ne provoqueraient donc pas systématiquement la mort neuronale observée dans ce modèle de souris tauopathiques. Ces données donnent lieu à la question suivante : est-ce que les DNF sont des marqueurs secondaires de la véritable cascade neurotoxique ou est-ce qu'ils représentent une réponse neuronale de protection, permettant la séquestration d'espèces

neurotoxiques dans la forme stable la moins nuisible, comme cela a été montré pour la protéine huntingtin ?

Deux études récentes ont montré qu'un traitement chronique par le lithium réduit les lésions tau et la neurodégénérescence chez les souris transgéniques surexprimant un variant de tau humain porteur de la mutation P301L (Noble et al, 2005 ; Nakashima et al, 2005). Pour ces auteurs, cet effet protecteur est associé à l'inhibition de GSK-3 $\beta$  et à la déphosphorylation de tau qui en découle (Noble et al, 2005) ainsi qu'à l'ubiquitinylation de tau (Nakashima et al, 2005). De nombreux travaux réalisés à la fois *in vivo* et *in vitro* suggèrent que le lithium exerce des effets multiples sur les neurotransmetteurs, les cascades de transduction des signaux, l'expression de certains gènes... (Jope, 1999). Le lithium est aussi connu pour son effet neuroprotecteur à l'encontre de divers stress cellulaires tels que la privation de sérum (Volonte et Rukenstein, 1993), la toxicité du peptide  $\beta$ -amyloïde (Alvarez et al, 1999) ou l'excitotoxicité du glutamate (Nonaka et al, 1998). De nombreuses hypothèses ont été émises concernant les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'effet neuroprotecteur du lithium. Le lithium pourrait exercer son effet neuroprotecteur en régulant de façon positive l'expression de protéines de survie (Bcl-2, protéines de choc thermique,  $\beta$ -caténine...) et/ou en régulant négativement l'expression de protéines impliquées dans la mort cellulaire (p53, Bax, caspases, production de peptides A $\beta$ , protéine tau hyperphosphorylée...) (Wada et al, 2005). Parmi les mécanismes de neuroprotection évoqués, une hypothèse majeure concerne l'inhibition de GSK-3 $\beta$  par le lithium (Li et al, 2000b ; Li et al, 2002). Le lithium est un médicament utilisé dans le traitement des troubles bipolaires depuis de nombreuses années (Lenox et Hahn, 2000). Cependant, les mécanismes moléculaires de cette action thérapeutique ne sont pas clairement élucidés à ce jour. D'après Noble et collaborateurs (2005), l'effet neuroprotecteur du lithium à l'encontre des lésions tau, observées chez les souris transgéniques, serait lié à la déphosphorylation de tau via GSK-3 $\beta$ .

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons cherché à déterminer dans notre modèle de culture cellulaire si le lithium peut moduler le niveau de protéines tau dans les neurones.

Nous avons clairement démontré que l'exposition au lithium mène à une diminution dose-dépendante de la quantité de protéine tau. Une des questions majeures soulevées par ce

résultat est : cette diminution de la quantité de protéines tau, induite par le lithium, résulte-t-elle d'une perte neuronale ? D'Mello et collaborateurs (1994) ont montré que l'exposition à une relativement forte concentration de lithium (10 mM, pendant 48h) pouvait induire l'apoptose dans des cultures de neurones immatures en grain du cervelet tandis que le même traitement est neuroprotecteur pour les neurones matures. Dans une autre étude, Takahashi et collaborateurs (1999), ont montré que le lithium (à des concentrations de 2 à 10 mM pendant 48h) inhibe de façon réversible la pousse neuritique dans des neurones corticaux immatures en culture. Ils ont montré que cette inhibition réversible de la pousse neuritique est associée à une diminution de la phosphorylation de la protéine tau dépendante de GSK-3 $\beta$ . Dans notre étude, nous avons utilisé des cultures de neurones corticaux après 7 jours de culture *in vitro*. L'analyse de la survie cellulaire et de la mort cellulaire apoptotique a montré que l'exposition au lithium, utilisé aux concentrations allant de 1,25 à 7,5 mM pendant 8h, n'induit pas d'apoptose neuronale. Ces données sont différentes des nôtres car la concentration de lithium ainsi que le temps d'exposition étaient différents (10 mM pour 48h dans l'étude de D'Mello et < à 10 mM pendant 8h dans notre étude). Par ailleurs, Hashimoto et collaborateurs (2003) ont montré que le lithium peut augmenter la survie cellulaire de neurones hippocampiques en culture et ce par la stimulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux. Nos observations sont en accord avec ce que ces auteurs ont démontré car, après exposition au lithium de nos cultures, nous avons observé une augmentation de la survie cellulaire.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer si la diminution de la quantité de protéines tau, induite par le lithium, était corrélée à l'activation de processus protéolytiques. Dans notre modèle, étant donné que le lithium n'induit pas d'apoptose aux concentrations utilisées, il n'est pas surprenant d'observer que l'exposition au lithium n'induit pas d'activation des caspases. D'autres études rapportent que l'activité des caspases peut être induite par de fortes concentrations de lithium (10 et 20 mM) qui sont supérieures à celles que nous avons utilisées (Song et al, 2004). Dans notre étude nous démontrons que l'inhibition des caspases par un inhibiteur à large spectre des caspases (Boc-D-FMK) est incapable d'inverser la diminution de tau induite par le lithium. Ces résultats indiquent que cette diminution de la quantité de protéines tau que nous observons dans les neurones ne résulte pas de l'activité protéolytique des caspases.

Nous avons ensuite examiné l'éventualité que les calpaïnes soient impliquées dans la diminution de quantité de protéines tau induite par le lithium. L'inhibition des calpaïnes par le

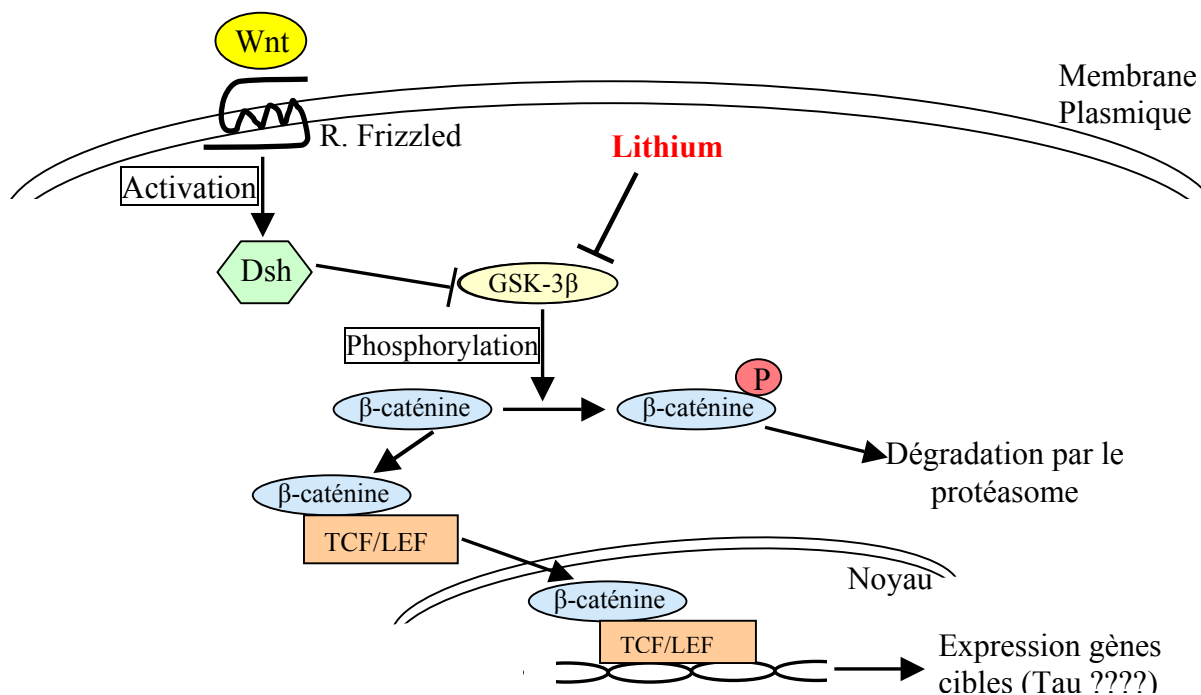
N-acétyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN) n'a pas empêché la diminution induite par le lithium de la quantité de protéines tau, indiquant que ces protéases ne sont pas impliquées dans cette diminution de tau.

Un autre processus protéolytique pourrait être à l'origine de la diminution de tau induite par le lithium : la dégradation des protéines de façon ubiquitine dépendante par le protéasome. Il a été rapporté précédemment que la protéine tau pouvait être ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. Cette ubiquitinylation de tau peut être régulée par une protéine co-chaperonne « ubiquitine ligase », CHIP, qui interagit directement avec la protéine chaperonne Hsp70 formant le complexe CHIP/HSP70 et induisant l'ubiquitinylation de la protéine tau. CHIP peut également augmenter l'agrégation de la protéine tau. Ce système CHIP/Hsp70 joue un rôle important dans la régulation du renouvellement des protéines tau et dans l'élimination sélective de la protéine tau anormale (Petrucci et al, 2004). Cependant, dans notre étude, le blocage du protéasome par son inhibiteur MG132 n'empêche pas la diminution de la quantité de protéines tau après le traitement au lithium et accentue la diminution des protéines tau induite par le lithium. De plus, MG132 seul diminue la quantité de protéines tau dans notre modèle. Or, des observations similaires ont été précédemment rapportées à la fois dans des cultures primaires de neurones corticaux (Suh et al, 2005) et dans des cultures de lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y (Delobel et al, 2005). Dans la lignée SH-SY5Y, la diminution des protéines tau résulterait de l'inhibition de la dégradation dépendante du protéasome de la calpastatin, un inhibiteur cellulaire des calpaïnes et pourrait ainsi mener à la dégradation de tau par les calpaïnes (Delobel et al, 2005).

L'absence d'implication des principaux processus protéolytiques dans la diminution de la quantité de protéines tau induite par le lithium nous a conduit à émettre l'hypothèse que cette diminution de tau pourrait résulter de l'action du lithium sur des régulateurs de transcription qui modulent l'expression du gène de tau. Il a été rapporté que le lithium module l'expression de nombreux gènes et, de nombreux chercheurs ont émis l'hypothèse que les effets du lithium sur l'expression des gènes pourrait être un mode d'action important de son effet thérapeutique (Jope et Bijur, 2002). En effet, l'inhibition de GSK-3 $\beta$  par le lithium régule l'activité de plusieurs facteurs de transcription. Parmi ces facteurs, il y a la  $\beta$ -caténine qui est un effecteur en aval de la voie de signalisation Wnt décrite dans l'introduction bibliographique (partie 3-



II) et rappelée dans la Figure 68. Par cette voie, le lithium en inhibant GSK-3 $\beta$  stabilise la  $\beta$ -caténine et de ce fait mime la voie de signalisation Wnt.



**Figure 68 : Régulation de la transcription des gènes par la voie de signalisation Wnt et par le lithium (d'après Lenox et Wang, 2003).**

Afin de déterminer si l'expression de tau peut être modulée par le lithium, nous avons réalisé une analyse par RT-PCR quantitative. Cette dernière a révélé que l'exposition au lithium induisait une diminution significative de l'ARNm de tau. Ces données indiquent donc que la diminution de la quantité de protéines tau après traitement au lithium est due à une régulation négative de la transcription du gène tau. De plus, dans notre étude, des immunoblots ont montré qu'une exposition au lithium conduit à une augmentation de la quantité de  $\beta$ -caténine. Nous avons également démontré que l'inhibition du protéasome par MG132 conduit à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine ainsi qu'à la diminution de la quantité de protéines tau dans les neurones. L'implication de la  $\beta$ -caténine dans la diminution de l'expression du gène de tau induite par le lithium (et par l'inhibition du protéasome) pourrait faire intervenir les acteurs moléculaires de la voie Wnt. Des travaux complémentaires de transfection avec, par exemple, une protéine GSK-3 $\beta$  constitutivement active et avec un dominant négatif GSK-3 $\beta$  Y216F ou encore avec la  $\beta$ -caténine seront nécessaires pour démontrer cette hypothèse. En effet, la  $\beta$ -caténine n'est pas le seul facteur de transcription contrôlé par le lithium. L'activité de nombreux facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B,

CREB et p53 peut être régulée par le lithium (Chuang et al, 2002). Il est intéressant de noter que l'activation de la voie de signalisation Wnt empêche la neurodégénérescence induite par les fibrilles  $\beta$ -amyloïdes (De Ferrari et al, 2003). Ainsi, il a été proposé par Caricasole et collaborateurs (2003), que l'activation de la voie de signalisation Wnt pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique à employer dans la maladie d'Alzheimer.

Enfin, nous nous sommes posés la question suivante : est-ce que la diminution de la quantité de protéines tau induite par le lithium a un effet neuroprotecteur ? Notre étude a démontré qu'une pré-exposition des cellules à 2,5 mM de lithium pendant 8h (une concentration réduisant la quantité de protéines tau) prévient l'apoptose neuronale induite par le peptide  $A\beta$ . Bien que ces observations ne démontrent pas formellement que la régulation négative de l'expression de tau est directement responsable de cet effet neuroprotecteur du lithium, de plus en plus d'arguments suggèrent que tau pourrait avoir un rôle clé dans la cascade d'événements menant à la neurodégénérescence induite par le peptide  $A\beta$  dans les neurones en culture. En effet, des études sur des neurones en culture ont récemment démontré que la protéine tau peut médier l'apoptose induite par le peptide  $A\beta$ , probablement par la génération protéolytique de fragments tau pro-apoptotiques (Canu et al, 1998 ; Gamblin et al, 2003 ; Park et Ferreira, 2005). De plus, Rapoport et collaborateurs ont suggéré d'une part, que la protéine tau pourrait servir d'intermédiaire à la neurotoxicité  $A\beta$  vraisemblablement par la génération protéolytique de fibrilles et de fragments toxiques de tau, et d'autre part que la diminution de protéines tau pourrait constituer un mécanisme de neuroprotection à l'origine de la récupération des fonctions cognitives observée dans les modèles de souris tauopathiques (Rapoport et al, 2002). De façon intéressante, il a aussi été démontré que la protéine tau peut bloquer le transport des organites et augmenter le stress oxydatif (Stamer et al, 2002), et plus récemment, que la protéine tau peut servir d'intermédiaire au récepteur NMDA pour induire la mort neuronale (Amadoro et al, 2006).

Toutes ces données nous conduisent à émettre l'hypothèse que le lithium pourrait interférer avec la formation des lésions tau à la fois en induisant la déphosphorylation de tau et, en diminuant la quantité de protéines tau. En outre, comme la protéine tau est principalement exprimée dans les neurones, la régulation négative de tau pourrait représenter un mécanisme supplémentaire par lequel le lithium pourrait exercer son effet cytoprotecteur dans le système nerveux central.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les mécanismes cellulaires initiateurs de l'agrégation de la protéine tau au cours des « tauopathies » et en particulier de la maladie d'Alzheimer, demeurent inconnus. La mort neuronale observée au cours de ces maladies est-elle cause ou conséquence de cette accumulation intraneuronale de protéines tau pathologiques?

L'hyperphosphorylation de la protéine tau à elle seule ne semble pas être suffisante pour induire la formation des PHF puis des DNF. En effet, le clivage de la protéine tau serait nécessaire et le fragment de 50 kDa, fibrillogène, pourrait favoriser l'extension des PHF en s'accumulant. La protéine tau interagit avec les microtubules et stabilise le cytosquelette neuronal. Cette interaction est régulée par la modification de l'état de phosphorylation de la protéine tau. Une hyperphosphorylation de tau la libère des microtubules et provoque une déstabilisation du cytosquelette. Or, une réorganisation du cytosquelette est observée au cours de l'apoptose, ce qui suggère que des modifications de l'état de phosphorylation de la protéine tau pourraient participer à ce processus de mort cellulaire.

Notre étude nous a permis de démontrer qu'au cours de l'apoptose, dans des neurones corticaux de rats, il se produit une phosphorylation et une déphosphorylation de la protéine tau. Toutefois ces deux phénomènes ne sont pas détectés au même stade de l'apoptose. Nos travaux ont permis d'établir que la phosphorylation précède la déphosphorylation de la protéine tau et que cette déphosphorylation est nécessaire pour son clivage et sa dégradation. Cette étude a également permis de montrer que la protéine tau, tout d'abord déphosphorylée, est ensuite clivée par les caspases et les calpaïnes.

En outre, nous avons également montré qu'une déphosphorylation préalable de la protéine tau par le lithium, un inhibiteur de GSK-3 $\beta$ , potentialise le clivage de tau et augmente la sensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine.

A l'inverse, en inhibant les phosphatases PP2A et par conséquent la déphosphorylation de la protéine tau, le clivage et la dégradation sont bloqués et conduisent à l'accumulation de la protéine tau hyperphosphorylée. Ainsi, l'absence d'une action phosphatasique efficace empêche la dégradation protéolytique de la protéine tau. Ce mécanisme pourrait se produire dans la maladie d'Alzheimer, car il a été démontré que chez les patients Alzheimeriens les neurones ont une activité phosphatasique très réduite. Cette accumulation de protéine tau dans

le cytosol pourrait conduire à la formation de PHF. La persistance des neurones contenant les PHF pourrait contribuer à la création d'un environnement toxique pour les neurones voisins, ce qui entraîne une extension de la dégénérescence neuronale. Il sera intéressant de déterminer si le blocage du clivage et de la dégradation de tau est dû à l'inhibition de la PP2A et non à l'inhibition d'autres phosphatases telles que la PP1, PP4 et PP5. Pour cela, il nous faudra mettre en œuvre des transfections dans une lignée cellulaire humaine de neuroblastome telle que SH-SY5Y avec des cDNA codant pour différentes sous-unités de la PP2A, notamment la sous-unité catalytique qui est responsable de l'activité enzymatique de la PP2A, mais aussi les deux sous-unités régulatrices qui sont exprimées spécifiquement dans le cerveau. Il faudra également déterminer, grâce à un modèle acellulaire, si l'inhibition de la PP2A diminue directement le clivage de tau ou bien si cette inhibition empêche à son tour l'activité des protéases (comme les caspases) impliquées dans ce clivage.

Si la phosphorylation est réellement à l'origine de la « résistance » de la protéine tau au clivage et compte tenu que de nombreux sites peuvent être régulés par la phosphorylation grâce à des kinases, il sera intéressant de déterminer les sites impliqués dans le blocage de la dégradation protéolytique de tau. Pour cela il faudra envisager de faire de la mutagenèse dirigée sur des sites de phosphorylation stratégiques tels que, par exemple, le site Ser<sup>422</sup> situé immédiatement après le site de clivage par les caspases Asp<sup>421</sup> puis, transfecter ces construits dans la lignée cellulaire humaine de neuroblastome (SH-SY5Y).

Dans ce travail nous avons également montré qu'un traitement dans des cultures primaires de neurones corticaux de rats par le lithium, entraîne une diminution de la quantité de protéines tau, et que cette diminution n'est pas due à une dégradation protéolytique mais à une baisse des transcrits de tau.

Il nous semble important de déterminer quelle voie de signalisation peut être impliquée dans la diminution de la quantité de tau. Une des hypothèses les plus évidentes serait l'implication de la voie Wnt. En effet, le lithium mime la voie Wnt où la GSK-3 $\beta$  phosphoryle de nombreux facteurs de transcription (notamment la  $\beta$ -caténine), qui se transloquent alors dans le noyau et modulent ainsi l'expression de nombreux gènes. Nous pourrions étudier l'implication des acteurs moléculaires tels que la GSK-3 $\beta$  et tels que la  $\beta$ -caténine en réalisant des transfections dans la lignée neuronale humaine SH-SY5Y.

Notre étude a montré que d'une part en favorisant la déphosphorylation de la protéine tau la dégradation de tau est augmentée. D'autre part, le traitement des neurones par le lithium diminue les niveaux de tau. Ces résultats suggèrent que de nouvelles stratégies thérapeutiques pourraient être développées dans le domaine des tauopathies et en particulier dans la maladie d'Alzheimer, dans le but de favoriser la clairance de la protéine tau dans les neurones. Ces stratégies viseraient à réduire les formes toxiques de tau (telles que les PHF ou les DNF) dans les neurones en interférant avec leur formation et/ou en augmentant leur dégradation et donc leur élimination. Outre ces stratégies visant à agir directement sur la protéine tau, d'autres cibles thérapeutiques potentiellement impliquées dans le métabolisme de tau tel que les voies de signalisation de Wnt pourraient être étudiées.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## A

**Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME.** Molecular ordering of the signaling events of CD95. *Mol Cell Biol.* 2002; **22**: 207-220.

**Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini, MG, Goedert M.** Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci.* 2002; **22**: 9340-9351.

**Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996; **87**: 171.

**Alonso ADC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; **91**: 5562-5566.

**Alonso ADC, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K.** Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; **94**: 298-303.

**Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J.** Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Letters.* 1999; **453**: 260-264.

**Alzheimer A.** Uber eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. *Allg Z Psychiat.* 1907; **64**: 146-148.

**Amadoro G, Ciotti MT, Costanzi M, Cestari V, Calissano P, Canu N.** NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; **103**: 2892-2897.

**Ameisen JC.** On the origin, evolution, and nature of programmed cell death : a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* 2002; **9**: 367-393.

**Andermarcher E, Bossis G, Farras R, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M.** La dégradation protéasomique. De l'adressage des protéines aux nouvelles perspectives thérapeutiques. *Médecine/Sciences.* 2005 ; **21** : 141-149.

**Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P.** Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem.* 2003; **86**: 582-590.

**Andreadis A, Brown WM, Kosik KS.** Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry.* 1992; **31**: 10626-10633.

**Anel A, Gamen S, Alava MA, Schmitt-Verhulst AM, Pineiro A, Naval J.** Inhibition of CPP32-like proteases prevents granzyme B- and Fas-, but not granzyme A-based cytotoxicity exerted by CTL clones. *J Immunol.* 1997; **158**: 1999-2006.

**Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rüdiger J, Van der Zee EA, Harkany T, Holzer M, Härtig W.** Reversible Paired Helical Filament-Like Phosphorylation of Tau Is an Adaptive Process Associated with Neuronal Plasticity in Hibernating Animals. *The Journal of Neuroscience.* 2003; **23**: 6972– 6981.



**Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT.** Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992; **42**: 631-639.

## B

**Bancher C, Braak H, Fischer P, Jellinger KA.** Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 1993; **162**: 179-182.

**Baum L, Seger R, Woodgett JR, Kawabata S, Maruyama K, Koyama M, Silver J, Saitoh T.** Overexpressed tau protein in cultured cells is phosphorylated without formation of PHF: implication of phosphoprotein phosphatase involvement. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995 ; **34**, 1-17.

**Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, Arnold SE.** Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Arch Neurol*. 2004; **61**: 378-384.

**Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E.** Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*. 1993; **11**:153-163.

**Biernat J, Mandelkow EM.** The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell*. 1999; **10**: 727-740.

**Bijur GN, De Sarno P, Jope RS.** Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis: Protection by lithium. *J Biol Chem*. 2000; **275**: 7583-7590.

**Billingsley ML, Kincaid RL.** Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein : effects on microtubule interaction, intercellular trafficking and neurodegeneration. *J Biochem*. 1997; **323**: 577-591.

**Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI.** The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*. 1985; **101**: 1371-1378.

**Blasko I, Apochal A, Boeck G, Hartmann T, Gubeck-Loebenstein B, Ransmayr G.** Ibuprofen decreases cytokine-induced amyloid beta production in neuronal cells. *Neurobiol Dis*. 2001; **8**: 1094-1101.

**Boix J, Llecha N, Yuste VJ, Comella JX.** Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacology*. 1997; **36**: 811-821.

**Bonfoco E, Ceccatelli S, Manzo L, Nicotera P.** Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp Cell Res*. 1995; **218**: 189-200.

**Borner C.** The Bcl-2 protein family : sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003 ; **39** : 615-647.

**Bortner CD, Cidlowski JA.** Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes . *Am J Physiol*. 1996 ; **271** : 950-961.

**Boutajangout A, Boom A, Leroy K, Brion JP.** Expression of tau mRNA and soluble tau isoforms in affected and non-affected brain areas in Alzheimer's disease. *FEBS Lett*. 2004; **576**: 183-189.

**Boyne LJ, Tessler A, Muray M, Fisher I.** Distribution of big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *J Comp Neurol.* 1995; **358**: 279-293.

**Braak H, Braak E.** Neuropil threads occur in dendrites of tangles-bearing nerve cells. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998; **14**: 39-44.

**Brandt R, Lee G.** The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. *J Neurochem.* 1993a; **61**: 997-1005.

**Brandt R, Lee G.** Functional organization of microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem.* 1993b; **268**: 3414-3419.

**Brandt R, Leger J, Lee G.** Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol.* 1995; **131**: 1327-1340.

**Brion JP, Guilleminot J, Couchie D, Flament-Durand J, Nunez J.** Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neurosci.* 1988; **25**: 139-146.

**Brun A, Englund B, Gustafson L, Passant U, Mann DMA, Neary D, Snowden JS.** Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994; **57**: 416-418.

**Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X.** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999 ; **15** : 269-290.

**Buée L, Delacourte A.** La maladie d'Alzheimer : une tauopathie parmi d'autres ? *Médecine/Sciences.* 2002 ; **18** : 727-736.

**Buée L, Bussièrre T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR.** Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews.* 2000; **33**: 95-130.

**Buee-Scherrer V, Hof PR, Buee L, Leveugle B, Vermersch P, Perl DP, Olanow CW, Delacourte A.** Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol.* 1996; **91**: 351-359.

**Buee-Scherrer V, Buee L, Hof PR, Leveugle B, Gilles C, Loerzel AJ, Perl DP, Delacourte A.** Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam. Immunochemical characterization of tau proteins. *Am J Pathol.* 1995; **146**: 924-932.

**Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC.** Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* 1999; **112**: 1743-1753.

**Bussièrre T, Hof PR, Mailliot C, Brown CD, Caillet-Boudin ML, Perl DP, Buée L, Delacourte A.** Phosphorylated serine 422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol.* 1999 ; **97** : 221-230.

## C

**Caceres A, Potrebic S, Kosik KS.** The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci.* 1991; **11**: 1515-1523.

- Caillet-Boudin ML, Delacourte A.** Induction of a specific tau Alzheimer epitope in SY-5Y neuroblastoma cells. *NeuroReport*. 1996; **8**: 307-310.
- Cain K, Bratton SB, Cohen GM.** The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*. 2002; **84**: 203-214.
- Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M.** Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature*. 1998; **395**: 755-756.
- Canu N, Dus L, Barbato C, Ciotti MT, Brancolini C, Rinaldi AM, Novak M, Cattaneo A, Bradbury A, Calissano P.** Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci*. 1998; **18**: 7061-7074.
- Caricasole A, Copani A, Caruso A, Caraci F, Iacovelli L, Sortino MA, Terstappen GC, Nicoletti F.** The Wnt pathway, cell-cycle activation and beta-amyloid: novel therapeutic strategies in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci*. 2003; **24**: 233-238.
- Centeno F, Mora A, Fuentes JM, Soler G, Claro E.** Partial lithium-associated protection against apoptosis induced by C2-ceramide in cerebellar granule neurons. *Neuroreport*. 1998; **9**: 4199-4203.
- Chang RC, Wong AK, Ng HK, Hugon J.** Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2002; **13**: 2429-2432.
- Chambers CB, Lee JM, Troncoso JC, Reich S, Muma NA.** Overexpression of four-repeat tau mRNA isoforms in progressive supranuclear palsy but not in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999; **46**: 325-332.
- Chen F, David D, Ferrari A, Götz J.** Posttranslational modifications of tau – role in human tauopathies and modelling in transgenic animals. *Current Drug Targets*. 2004; **5**: 1-13.
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N.** Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 1992; **360**: 674-677.
- Cho JH, Johnson GV.** Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 187-193.
- Cho JH, Johnson GV.** 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*. 2004; **88**: 349-358.
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; **162**: 156-159.
- Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorov V, Kanai H, Hough C, Hiroi T, Leeds P.** Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord*. 2002; **4**: 129-136.
- Chung CW, Hong YM, Song S, Woo HN, Choi YH, Rohn T, Jung YK.** Atypical role of proximal caspase-8 in truncated tau-induced neurite regression and neuronal cell death. *Neurobiol Dis*. 2003; **14**: 557-566.
- Chung CW, Song YH, Kim IK, Yoon WJ, Ryu BR, Jo DG, Woo HN, Kwon YK, Kim HH, Gwag BJ, Mook-Jung IH, Jung YK.** Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol Dis*. 2001; **8**: 162-172.

**Citron M.**  $\beta$ -secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease-promise and challenge. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; **25**: 92-97.

**Clarke PGH.** Developmental cell death : morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol.* 1990; **181**: 195-213.

**Collet J, Fehrat L, Pollard H, De Pouplana LR, Charton G, Bernard A, Moreau J, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M.** Developmentally regulated alternative splicing of mRNAs encoding N-terminal tau variants in the rat hippocampus: structural and functional implications. *Eur J Neurosci.* 1997; **9**: 2723-2733.

**Combs CK, Johnson DE, Cannady SB, Lehman TM, Landreth GE.** Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J Neurosci.* 1999; **19**: 928-939.

**Comer FI, Hart GW.** O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 29179-29182.

**Cotman CW, Poon WW, Rissman RA, Blurton-Jones M.** The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; **64**: 104-112.

**Couchie D, Charriere-Bertrand D, Nunez J.** Expression of the mRNA for tau proteins during brain development and in cultured neurons and astroglial cells. *J Neurochem.* 1988; **50**: 1894-1899.

**Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RKH, Shelanski ML, Nunez J.** Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; **89**: 4378-4381.

**Couzinet A, Hérincs Z and Hueber AO.** Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Médecine/Sciences.* 2002. **18** : 841-852.

**Crompton M.** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999; **341**: 223-249.

**Crook NE, Clem RJ, Miller LK.** An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol.* 1993; **67**: 2168-2174.

**Cross DA, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD.** Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *Journal of Neurochemistry* 2001; **77**: 94-102.

## D

**D'Mello SR, Anelli R, Calissano P.** Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons. *Exp Cell Res* 1994; **211**: 332-338.

**Dale TC.** Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J.* 1998; **329**: 209-223.

**D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG.** Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.* 1999; **342**: 249-268.

**Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C, Trucco C, Flatter E, De La Rubia G, Oliver J, Rolli V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G.** Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie.* 1999; **81**: 69-75.

- Davis PK, Johnson GV.** The microtubule binding of Tau and high molecular weight Tau in apoptotic PC12 cells is impaired because of altered phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 35686-35692.
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP.** Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci.* 2001; **114**: 1179-1187.
- De Ferrari GV, Chacon MA, Barria MI, Garrido JL, Godoy JA, Olivares G Reyes AE, Alvarez A, Bronfman M, Inestrosa NC.** Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by  $\beta$ -amyloid fibrils. *Molecular Psychiatry* 2003; **8**: 195-208.
- Delacourte A, Défossez A.** Alzheimer's disease : Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci.* 1986 ; **76**: 173-186.
- Delacourte A.** Le retour de la protéine tau. *La Recherche.* 2003 ; **Hors Série N°10** : 44-48.
- Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, Gauvreau D, Robitaille Y.** Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol.* 1998 ; **43**: 193-204.
- Delacourte A, Buée L.** Normal and pathological tau proteins as factors for microtubule assembly. *Int Rev Cytol.* 1997; **171**: 167-224.
- Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N, Buée L, Hof PR, Wattez A, Laroche-Cholette A, Mathieu J, Chagnon P, Gauvreau D.** Specific pathological tau protein variants characterize Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996; **55**: 159-168.
- Delacourte A, Buée L.** Tau pathology : a marker of neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol.* 2000 ; **13**: 371-376.
- Delacourte A, Sergeant N, Champain D, Wattez A, Maurage CA, Lebert F, Pasquier F, David JP.** Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 2002 ; **59**: 398-407.
- De la Monte SM, Sohn YK, Ganju N, Wands JR.** P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab Invest.* 1998; **78**: 401-404.
- De la Monte SM, Sohn YK, Wands JR.** Correlates of p53-and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1997 ; **152**: 73-83.
- Delobel P, Flament S, Hamdane M, Mailliot C, Sambo AV, Bégard S, Sergeant N, Delacourte A, Vilain JP, Buée L.** Abnormal Tau phosphorylation of the Alzheimer-type also occurs during mitosis. *Journal of Neurochemistry.* 2002; **83**: 412-420.
- Delobel P, Leroy O, Hamdane M, Sambo AV, Delacourte A, Buee L.** Proteasome inhibition and tau proteolysis: an unexpected regulation. *FEBS Letters.* 2005; **579**: 1-5.
- Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A.** Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* 1996; **15**: 3861-3870.
- De Vrij FM, Sluijs JA, Gregori L, Fischer DF, Hermens WT, Goldgaber D, Verhaagen J, Van Leeuwen FW, Hol EM.** Mutant ubiquitin expressed in Alzheimer's disease causes neuronal death. *FASEB J.* 2001; **15**: 2680-2688.

**Di Rosa G, Odrijin T, Nixon RA, Arancio O.** Calpain inhibitors: a treatment for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2002; **19**: 135-141.

**Doble BW, Woodgett JR.** GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003; **116**: 1175-1186.

**Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW.** Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell.* 1993; **3**: 1141-1154.

**Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E.** Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem.* 1995; **270**: 7679-7688.

**Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E.** MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* 1997; **89**: 297-308.

**Drubin DG, Kirschner MW.** Tau protein function in living cells. *J Cell Biol.* 1986; **103**: 2739-2746.

**Dudek SM, Johnson GV.** Postnatal changes in serine/ threonine protein phosphatases and their association with the microtubules. *Dev Brain Res.* 1995; **90**: 54-61.

## E

**Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH.** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999 ; **68**: 383-424.

**Ehlers MD.** Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci.* 2003; **6**: 231-242.

**Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR.** Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.* 1991; **7**: 663-698.

**Esclaire F, Lesort M, Blanchard C, Hugon J.** Glutamate toxicity enhances tau gene expression in neuronal cultures. *J Neurosci Res.* 1997; **49**: 309-318.

**Esclaire F, Terro F, Yardin C, Hugon J.** Neuronal apoptosis is associated with a decrease in tau mRNA expression. *Neuroreport.* 1998; **9**: 1173-1177.

**Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC.** Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol cell Biol.* 2000; **20**: 929-935.

## F

**Facci L, Stevens DA, Skaper SD.** Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport.* 2003; **14**: 1467-1470.

**Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS.** Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem.* 2000 ; **275** :2581-2588.

**Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast RC Jr, Boyd D, Mills GB.** Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene*. 1999 ; **18**: 6635-6640.

**Farmer G, Colgan J, Nakatani Y, Manley JL, Prives C.** Functional interaction between p53, the TATA-binding protein (TBP), and TBP-associated factors in vivo. *Mol Cell Biol*. 1996; **16**: 4295-4304.

**Feuk L, Prince JA, Breen G, Emahazion T, Carothers A, St Clair D, Brookes AJ.** Apolipoprotein-E dependent role for the FAS receptor in early onset Alzheimer's disease: finding of a positive association for a polymorphism in the TNFRSF6 gene. *Hum Genet*. 2000; **107**: 391-396.

**Flemming LM, Johnson GV.** Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP. *Biochem J*. 1995; **309**: 41-47.

**Forno LS.** Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996; **55**: 259-272.

**Frame S, Cohen P.** GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochemical Journal*. 2001; **359**: 1-16.

**Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM.** Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ*. 1998; **5**: 884-893.

## G

**Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL.** Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; **100**: 10032-10037.

**Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F.** Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*. 1995; **373**: 523-527.

**Garruto RM.** Pacific paradigms of environmentally-induced neurological disorders: clinical, epidemiological and molecular perspectives. *Neurotoxicology*. 1991; **12**: 347-377.

**Gastard MC, Troncoso JC, Koliatsos VE.** Caspase activation in the limbic cortex of subjects with early Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2003; **54**: 393-398.

**Georgieff IS, Liem RK, Couchie D, Mavilia J, Nunez J, Shelanski ML.** Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci*. 1993; **105**: 729-737.

**Gervais FG, Singaraja R, Xanthoudakis S, Gutekunst CA, Leavitt BR, Metzler M, Hackam AS, Tam J, Vaillancourt JP, Houtzager V, Rasper DM, Roy S, Hayden MR, Nicholson DW.** Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. *Nat Cell Biol*. 2002; **4**: 95-105.

**Glenner GG, Wong CW.** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; **120**: 885-890.

- Goedert M, Jakes R.** Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerisation. *EMBO J.* 1990; **9**: 4225-4230.
- Goedert M, Jakes R, Qi Z, Wang JH, Cohen P.** Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinases. *J Neurochem.* 1995; **65**: 2804-2807.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P.** Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem J.* 1994; **301**: 871-877.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA.** Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 1989a; **3**: 519-526.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA.** 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.* 1989b; **8**: 393-399.
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A.** Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; **85**: 4051-4055.
- Goldrath A, Bevan M.** Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* 1999 ; **402**: 255-262.
- Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT.** Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1997; **41**: 17-24.
- Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem.* 1995; **65**: 732-738.
- Gong CX, Liu F, Wu G, Rossie S, Wegiel J, Li L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. *J Neurochem.* 2004; **88**: 298-310.
- Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP.** Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1996; **149**: 21-28.
- Goto S, Yamamoto H, Fukunaga K, Iwasa T, Matsukado Y, Miyamoto E.** Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin. *J Neurochem.* 1985; **45**: 276-283.
- Gotoh T, Oyadomari S, Mori K, Mori M.** Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 12343-12350.
- Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schafer T, Jakes R, Burki K, Goedert M.** Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J.* 1995; **14**: 1304-1313.
- Gotz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM.** Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem.* 2001a; **276**: 529-534.



- Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM.** Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*. 2001b; **293**: 1491-1495.
- Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartweg E, Steller H.** Induction of apoptosis by drosophila reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J*. 2000; **19**: 589-597.
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI.** Hydrofluoric acid-treated tau-PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem*. 1992; **267**: 564-569.
- Greenberg SG, Davies P.** A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; **87**: 5827-5831.
- Greenberg AH.** Granzyme B-induced apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 1996; **406**: 219-228.
- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC.** Analyse génétique moderne. 1<sup>ère</sup> édition. Paris : De Boeck Université, 2001, 676 p.
- Grimes CA, Jope RS.** The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*. 2001; **65**: 391-426.
- Gu Y, Oyama F, Ihara Y.** Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem*. 1996; **67**: 1235-1244.
- Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM.** Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2003; **60**: 729-736.
- Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Reynolds MR, Horowitz PM, Fu Y, Wang T, Cahill ME, Bigio EH, Berry RW, Binder LI.** Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2005; **26**: 1015-1022.
- Guimaraes AC, Linden R.** Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyle. *Eur J Biochem*. 2004; **271**: 1638-1650.
- Guo Q, Fu W, Xie J, Luo H, Sells SF, Geddes JW, Bondada V, Rangnekar VM, Mattson MP.** Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nature Med*. 1998 ; **4**: 957-962.
- Guo Q, Xie J.** AATF inhibits aberrant production of amyloid beta peptide 1-42 by interacting directly with Par-4. *J Biol Chem*. 2004 ; **279**: 4596-4603.
- Guo H, Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C, LeBlanc AC.** Active Caspase-6 and Caspase-6-Cleaved Tau in Neuropil Threads, Neuritic Plaques, and Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease. *Am J Pathol*. 2004; **165**: 523-531.
- Gupta S.** Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncol*. 2003 ; **22**: 15-20.
- Gustafson L.** Clinical picture of frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. *Dementia*. 1993; **4**: 143-148.

## H

- Hall GF.** PHF-tau from Alzheimer brain is rapidly dephosphorylated and degraded when injected into neurons in situ. *J. Alzheimer's Dis*. 1999; **1**: 379-386.

**Hallows JL, Chen K, DePinho RA, Vincent I.** Decreased cyclin-dependant kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal proteins phosphorylation in p35 null mice. *J Neurosci.* 2003; **23**: 10633-10644.

**Hamdane M, Sambo AV, Delobel P, Begard S, Violleau A, Delacourte A, Bertrand P, Benavides J, Buee L.** Mitotic-like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 34026-34034.

**Han DK, Chaudhary PM, Wright ME, Friedman C, Trask BJ, Riedel RT, Baskin DG, Schwartz SM, Hood L.** MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 ; **94**: 11333-11338.

**Hanger DP, Brion JP, Gallo JM, Cairns NJ, Luthert PJ, Anderton BH.** Tau in Alzheimer's disease and Down's syndrome is insoluble and abnormally phosphorylated. *Biochem J.* 1991; **275**: 99-104.

**Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH.** 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.* 1992; **147**: 58-62.

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

**Harada H, Beknell B, WilmM, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ.** Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell.* 1999; **3**: 413-422.

**Hardy H, Allsop D.** Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharm Sci.* 1991 ; **12**: 383-388.

**Hardy H, Selkoe DJ.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; **297**: 353-356.

**Harmand PO.** Etude du processus apoptotique induit par l'acide ursolique sur deux lignées cellulaires humaines de la peau : les cellules HaT dérivées de kératinocytes humains et les M4Beu issues d'un mélanome humain. *Thèse de Doctorat*, Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 26 octobre 2004.

**Harriman JF, Liu XL, Aleo MD, Machaca K, Schnellmann RG.** Endoplasmic reticulum Ca(2+) signaling and calpains mediate renal cell death. *Cell Death Differ.* 2002; **9**: 734-741.

**Hashimoto R, Senatorov V, Kanai H, Leeds P, Chuang DM.** Lithium stimulates progenitor proliferation in cultured brain neurons. *Neuroscience.* 2003; **117**: 55-61.

**Hegde AN, DiAntonio A.** Ubiquitin and the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2002 ; **3**: 854-861.

**Hemmings BA, Yellowlees D, Kernohan JC, Cohen P.** Purification of glycogen synthase kinase 3 from rabbit skeletal muscle. Copurification with the activating factor (FA) of the (Mg-ATP) dependent protein phosphatase. *Eur J Biochem.* 1981; **119**: 443-451.

**Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; **407**: 770-776.

**Henriquez JP, Cross D, Vial C, Maccioni RB.** Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types. *Cell Biochem Funct.* 1995; **13**: 239-250.

- Herr I, Debatin KM.** Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 2001 ; **98**: 2603-2614.
- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z.** Role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci*. 2000; **20**: 2567-2674.
- Higuchi M, Lee VMY, Trojanowski JQ.** Tau and axonopathy in neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med*. 2002; **2**: 131-150.
- Himmler A.** Structure of the bovine tau gene : alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol*. 1989; **9**: 1389-1396.
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin Jr. DW.** Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol*. 1989; **9**: 1381-1388.
- Hinds MG, Lackmann M, Skea GL, Harrison PJ, Huang DC, Day CL.** The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO*. 2003; **22**: 1497-1507.
- Hinds MG, Norton RS, Vaux DL, Day CL.** Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol*. 1999; **6**: 648-651.
- Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S.** Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol*. 1988; **107**: 1449-1459.
- Hof PR, Nimchinsky EA, Morrison JH.** Neurochemical phenotype of corticocortical connections in the macaque monkey : quantitative analysis of a subset of neurofilament protein-immunoreactive projection neurons in frontal, parietal, temporal, and cingulate cortices. *J Comp Neurol*. 1995; **362**: 109-133.
- Horiguchi T, Uryu K, Giasson BI, Ischiropoulos H, Lightfoot R, Bellmann C, Richter-Landsberg C, Lee VM, Trojanowski JQ.** Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am J Pathol*. 2003; **163**: 1021-1031.
- Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL, Reynolds MR, Carroll CA, Weintraub ST, Bennett DA, Cryns VL, Berry RW, Binder LI.** Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2004; **24**: 7895-7902.
- Horvitz HR, Sternberg PW, Greenwald IS, Fixsen W, Ellis HM.** Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1983; **48**: 453-463.
- Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G.** Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J*. 1999; **18**: 3586-3595.

## I

- Ihara Y.** Massive somatodendritic sprouting of cortical neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1988; **459**: 138-144.
- Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Taniguchi M, Kudo T, Tohyama M.** The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2001; **1536**: 85-96.
- Ingelson M, Vanmechelen E, Lannfelt L.** Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci Lett*. 1996; **220**: 9-12.

**Iqbal K, Grundke-Iqbal I.** Ubiquitination and abnormal phosphorylation of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 1991; **5**: 399-410.

**Iqbal K, Alonso AC, Gong CX, Khatoon S, Pei JJ, Wang JZ, Grundke-Iqbal I.** Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm Suppl.* 1998; **53**: 169-180.

**Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J.** Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997 ; **388**: 190-195.

**Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM.** Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron.* 1999; **24**: 751-762.

**Ishihara T, Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VM.** Age-dependant induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol.* 2001; **158**: 555-562.

## J

**Janssens V, Goris J.** Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* 2001; **353**: 417-439.

**Jenkins SM, Zinnerman M, Garner C, Johnson GV.** Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J.* 2000; **345**: 263-70.

**Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L Jr, Hoffmann R, Davies P.** A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1997; **69**: 2087-2095.

**Johnson GV, Jenkins SM.** Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Dis.* 1999; **1**: 307-328.

**Johnson GVW et Stoothoff WH.** Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of cell science.* 2004; **117**, 5721-5729.

**Jolly C, Morimoto RI.** Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 2000; **92**: 1564-1572.

**Jope RS, Johnson GV.** The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 2004; **29**: 95-102.

**Jope RS, Bijur GN.** Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and cell survival. *Mol Psy.* 2002; **7**: S35-S45.

**Jope RS.** Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry.* 1999; **4**: 117-128.

**Jope RS.** Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; **24**: 441-443.

## K

**Kamemura K, Hart GW.** Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2003; **73**: 107-136.

**Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R, Borner C.** Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol.* 2003; **160**: 53-64.

**Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; **26**: 239-257.

**Khatoun S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Guanosine triphosphate binding to subunit of tubulin in Alzheimer's disease brain: role of microtubule-associated protein tau. *J Neurochem.* 1995; **64**: 77-87.

**Kidd M.** Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 1963; **197**: 192-193.

**Kins S, Kurosinski P, Nitsch RM, Gotz J.** Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am J Pathol.* 2003; **163**: 833-843.

**King ME.** Can tau filaments be both physiologically beneficial and toxic? *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005; **1739**: 260-267.

**Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME.** Cytotoxicity-dependant APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a cell death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 1995; **14**: 5579-5588.

**Klionsky DJ, Emr SD.** Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000; **290**: 1717-1721.

**Kosik KS, Greenberg SM.** Tau protein and Alzheimer disease. In *Alzheimer disease* Eds Terry RD, Katzman R, Bick KL. 1994; **20**: 335-344.

**Kosik KS, Finch EA.** MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J Neurosci.* 1987; **7**: 3142-3153.

**Kosik KS, Shimura H.** Phosphorylated tau and the neurodégénérative foldopathies. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005; **1739**: 298-310.

**Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL.** Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron.* 1989; **2**: 1389-1397.

**Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S.** Bcl-2 : prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 1997 ; **277** : 559-562.

**Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ, Williams LT.** Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997; **278**: 294-8.

**Kowall NW, Kosik KS.** Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterise the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1987; **22**: 639-643.

## L

- Ladner CJ, Czech J, Maurice J, Lorens SA, Lee JM.** Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease : correlation with neuropathologic changes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996; **55**: 924-931.
- Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM.** A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature.* 2002; **416**: 763-767.
- Leblanc AC.** Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003; **27**: 215-229.
- Lee G, Cowan M, Kirschner M.** The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science.* 1988; **239**: 285-288.
- Lee G, Neve RL, Kosik KS.** The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron.* 1989; **2**: 1615-1624.
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G.** Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci.* 1998; **111**: 3167-3177.
- Lee VMY, Goedert M, Trojanowski JQ.** Neurodegenerative tauopathies. *Ann Rev Neurosci.* 2001; **24**: 1121-1159.
- Lee VMY, Balin BJ, Otvos L Jr, Trojanowski JQ.** A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science.* 1991; **251**: 675-678.
- Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussiere T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML.** Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of tau proteins- a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta.* 2003; **1619**: 167-176.
- Leissring MA, Murphy MP, Mead TR, Akbari Y, Sugarman MC, Jannatipour M, Anliker B, Muller U, Saftig P, De Strooper B, Wolfe MS, Golde TE, LaFerla FM.** A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; **99**: 4697-4702.
- Lenox RH, Hahn CG.** Overview of the mechanism of action of lithium in the brain: fifty-year update. *J Clin Psychiatry.* 2000; **61**: 5-15.
- Lenox RH, McNamara RK, Papke RL, Manji HK.** Neurobiology of lithium: an update. *J Clin Psychiatry.* 1998; **59**: 37-47.
- Lenox RH, Wang L.** Molecular basis of lithium action : integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks. *Molecular Psychiatry.* 2003 ; **8**: 135-144.
- Lesort M, Blanchard C, Yardin C, Esclaire F, Hugon J.** Cultured neurons expressing phosphorylated tau are more resistant to apoptosis induced by NMDA or serum deprivation. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997; **45**: 127-132.
- Levee MG, Dabrowska MI, Lelli JL Jr, Hinshaw DB.** Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells. *Am J Physiol.* 1996; **271**: 1981-1992.
- Levine AJ.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997; **88**: 323-31.
- Levkau B, Garton KJ, Ferri N, Kloke K, Nofer JR, Baba HA, Raines EW, Breithardt G.** XIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB: new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res.* 2001; **88**: 282-290.

- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Murphy PM, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M.** Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet.* 2000; **25**: 402-405.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J.** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998; **94**: 491-501.
- Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, Williams RS.** Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell.* 2000a; **101**: 389-399.
- Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA.** Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *Mol Cell Biol.* 2000b; **20**: 9356-9363.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997; **91**: 479-89.
- Li X, Bijur GN, Jope RS.** Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disorders.* 2002; **2**: 137-144.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG.** Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 1996; **379**: 349-353.
- Litersky JM, Johnson GV.** Phosphorylation by camp-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem.* 1992; **267**: 1563-1568.
- Liu X, Rainey JJ, Harriman JF, Schnellmann RG.** Calpains mediate acute renal cell death: role of autolysis and translocation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; **281**: F728-738.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX.** Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3 $\beta$ . *FEBS Lett.* 2002; **530**: 209-214.
- Liu X, Van Vleet T, Schnellmann RG.** The Role of Calpain in Oncotic Cell Death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; **44**: 349-370.
- Longthorne VL, Williams GT.** Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.* 1997; **16**: 3805-3812.
- Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K.** The role of caspases in development, immunity and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity.* 1999; **10**: 629-639.
- Lovestone S, Reynolds CH.** The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodégénérative processes. *Neuroscience.* 1997; **78**: 309-324.
- Lovestone S, Davis DR, Webster MT, Kaech S, Brion JP, Matus A, Anderton BH.** Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations. *Biol Psychiatry.* 1999; **45**: 995-1003.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998; **94**: 481-490.
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG,**

**Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H.** ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science*. 2004; **304**: 448-452.

**Ly JD, Grubb DR, Lawen A.** The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003; **8**: 115-128.

## M

**Majno G, Hertig AT.** Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver. *Virchows Arch Patol Anat Physiol Klin Med*. 1960; **333**: 421-465.

**Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E.** Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging*. 2003; **24**: 1079-1085.

**Mandell JW, Banker GA.** A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci*. 1996; **16**: 5727-5740.

**Manji HK, Lenox RH.** Lithium: a molecular transducer of mood-stabilization in the treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 1998; **19**: 161-166.

**Manji HK, Lenox RH.** Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2000; **48**: 518-530.

**Martinou JC, Desagher S, Antonsson B.** Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol*. 2000; **2**: E41-3.

**Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J.** The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem*. 2002; **277**: 439-444.

**Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G.** The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*. 1998; **187**: 1261-1271.

**Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Vandevoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VMY.** Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*. 1994; **13**: 989-1002.

**Mate MJ, Ortiz-Lombardia M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, Penninger J, Kroemer G, Alzari PM.** The crystal structure of the mouse apoptosis inducing factor AIF. *Nat Struct Biol*. 2002; **9**: 442-446.

**Mattson MP.** Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2000; **1**: 120-129.

**Mattson MP, Kroemer G.** Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med*. 2003; **9**: 196-205.

**Matus A.** Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci*. 1994; **17**: 19-22.

**Mawal-Dewan M, Henley J, Van de Voorde A, Trojanowski JQ, Lee VM.** The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem*. 1994; **269**: 30981-30987.

**McCarthy JV, Dixit VM.** Apoptosis induced by Drosophila reaper and grim in a human system. Attenuation by inhibitor of apoptosis proteins (cIAPs). *J Biol Chem*. 1998; **273**: 24009-24015.



- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ.** Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 2001; **21**: 1249-1259.
- Merrick SE, Demoise DC, Lee VM.** Site-specific dephosphorylation of tau protein at Ser202/Thr205 in response to microtubule depolymerization in cultured human neurons involves protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1996; **271**: 5589-5594.
- Metzstein MM, Stanfield GM and Horvitz HR.** Genetics of programmed cell death in *C. Elegans* - past, present and future. *Trends Genet.* 1998; **14**: 410-16.
- Miyata Y, Hoshi M, Nishida E, Minami Y, Sakai H.** binding of microtubule-associated protein 2 and tau to the intermediate filament reassembled from neurofilament 70 kDa subunit protein. Its regulation by calmodulin. *J Biol Chem.* 1986; **261**: 13026-13030.
- Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J.** NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol.* 2001; **21**: 5299-5305.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM.** p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003; **11**: 577-590.
- Miles JC, Pittman RN.** Tau protein is dephosphorylated by an okadaic acid inhibitable phosphatase during neural apoptosis. *Soc Neurosci abstr.* 1995; **21**: 1304.
- Mills JC, Lee VM, Pittman RN.** Activation of a PP2A-like phosphatase and dephosphorylation of tau protein characterize onset of the execution phase of apoptosis. *J Cell Sci.* 1998; **111**: 625-636.
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J.** Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell.* 1993; **75**: 653-660.
- Morfini G, Szebenyi G, Brown H, Pant HC, Pigino G, DeBoer S, Beffert U, Brady ST.** A novel CDK5-dependant pathways for regulating GSK3activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J.* 2004; **23**: 2235-2245.
- Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME.** Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci.* 2001 ; **21** :7551-7560.
- Morrison JH, Hof PR.** Life and death of neurons in the aging brain. *Science.* 1997; **278** : 412-419.
- Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; **65**: 55-63.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L.** A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.* 1992; **1**: 345-347.
- Mumby MC, Walter G.** Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev.* 1993; **73**: 673-699.
- Munch G, Kuhla B, Luth HJ, Arendt T, Robinson SR.** Anti-AGEing defences against Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 2003; **31**: 1397-1399.

## N

- Nacharaju P, Ko L, Yen SH.** Characterization of in vitro glycation sites of tau. *J Neurochem.* 1997; **69**: 1709-1719.
- Nagata S.** Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997; **88**: 355-365.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A.** Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000 ; 143-151.
- Nakagawa T, Yuan J.** Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000; **150**: 887-894.
- Nakano K, Vousden KH.** PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001; **7**: 683-694.
- Nakashima H, Ishihara T, Suguimoto P, Yokota O, Oshima E, Kugo A, Terada S, Hamamura T, Trojanowski JQ, Lee VM, Kuroda S.** Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol* 2005; **110** : 547-556.
- Nakayama K, Negishi I, Kuide K, Sawa H, Loh DY.** Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; **91**: 3700-3704.
- Navon A, Goldberg AL.** Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. *Mol Cell.* 2001; **8**: 1339-1349.
- Nelson PT, Stefansson K, Gulcher J, Saper CB.** Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1996; **67**: 1622-1632.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA.** Identification of cDNA clones for human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein2. *Brain Res.* 1986; **387**: 271-280.
- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; **102**: 6990-6995.
- Nonaka S, Hough CJ, Chuang DM.** Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 1998; **95**: 2642-2647.
- Nunez J, Fischer I.** Microtubule-associated proteins (MAPs) in the peripheral nervous system during development and regeneration. *J Mol Neurosci.* 1997; **8**: 207-222.

## O

- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N.** Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000; **288**: 1053-1058.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM.** Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron.* 2003; **39**: 409-421.

**Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM.** Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron*. 2004; **43**: 321-332.

**Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Yamanaka T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Fujikawa K, Murata K, Nakano T.** Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest*. 2003; **83**: 1033-1043.

**Ono T, Yamamoto H, Tashima K, Nakashima H, Okumura E, Yamada K, Hisanaga S, Kishimoto T, Miyakawa T, Miyamoto E.** Dephosphorylation of abnormal sites of tau factor by protein phosphatases and its implication for Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 1995; **26**: 205-215.

**Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW.** Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 24735-24738.

**Oyadomari S, Araki E, Mori M.** Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis*. 2002; **7**: 335-345.

## P

**Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S.** Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*. 2000; **19**: 4310-4322.

**Pap M, Cooper GM.** Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 1998; **273**: 19929-19932.

**Park SY, Ferreira A.** The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates  $\beta$ -amyloid-induced neurodegeneration. *J Neurosci*. 2005; **25**: 5365-5375.

**Pasquier F, Lebert F.** Demences frontotemporales. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Neurologie*. 1998; 17-057-A-30, 10p.

**Perez M, Hernandez F, Lim F, Diaz-Nido J, Avila J.** Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis*. 2003; **5**: 301-308.

**Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P.** Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependant mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta*. 1994; **1187**: 255-259.

**Petrucelli L, Dickson D, Kehoe K, Taylor J, Snyder H, Grover A, De Lucia M, McGowan E, Lewis J, Prihar G, Kim J, Dillmann WH, Browne SE, Hall A, Voellmy R, Tsuboi Y, Dawson TM, Wolozin B, Hardy J, Hutton M.** CHIP and Hsp 70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 703-714.

**Platt N, da Silva RP and Gordon S.** Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol*. 1998; **8**: 365-72.

**Probst A, Gotz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jaton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Burki K, Goedert M.**

Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2000; **99**: 469-481.

**Przyborski SA, Cambray-Deakin MA.** Heterogeneity of tau protein and mRNA expression during the development of cerebellar granule cell neurons in vitro. *Dev Brain Res*. 1995; **87**: 29-45.

**Puthalakath H, Strasser A.** Keeping killers on a tight leash : transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. 2002; **9**: 505-512.

## R

**Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD.** Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*. 1993; **262**: 695-700.

**Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ*. 2004; **11**: 372-380.

**Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A.** Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; **99**: 6364-6369.

**Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G.** Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 2001; **3**: 839-843.

**Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G.** Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*. 2002; **192**: 131-137.

**Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, LaFerla FM, Rohn TT, Cotman CW.** Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest*. 2004; **114**: 121-130.

**Ron D, Habener JF.** CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*. 1992; **6**: 439-53.

**Rohn TT, Head E, Nesse WH, Cotman CW, Cribbs DH.** Activation of caspase-8 in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*. 2001; **8**: 1006-1016.

**Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW, Head E.** Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*. 2002; **11**: 341-354.

**Rosen DR, Martin-Morris L, Luo LQ, White K.** A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human  $\beta$ -amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; **86**: 2478-2482.

**Rudel T, Bokoch GM.** Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*. 1997; **276**: 1571-1574.

**Ruberg M, France-Lanord V, Brugg B, Lambeng N, Michel PP, Anglade P, Hunot S, Damier P, Faucheux B, Hirsch E, Agid Y.** La mort neuronale par apoptose dans la maladie de Parkinson. *Rev Neurol*. 1997; **153**: 499-508.

## S

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; **230**: 1350-1354.
- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA.** Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*. 1999; **107**: 489-506.
- Salvesen GS, Dixit VM.** Caspases: intracellular signalling by proteolysis. *Cell*. 1997; **91**: 443-446.
- Samejima K, Tone S, Earnshaw WC.** CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem*. 2001; **276**: 45427-45432.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH.** Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005; **309**: 476-481.
- Savopoulos JW, Carter PS, Turconi S, Pettman GR, Karran EH, Gray CW, Ward RV, Jenkins O, Creasy CL.** Expression, purification, functional analysis of the human serine protease HtrA2. *Protein Expr Purif*. 2000; **19**: 227-234.
- Scott CW, Spreen RC, Herman JL, Chow FP, Davison MD, Young J, Caputo CB.** Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. *J Biol Chem*. 1993; **268**: 1166-1173.
- Seitz A, Kojima H, Oiwa K, Mandelkow EM, Song YH, Mandelkow E.** Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *EMBO J*. 2002; **21**: 4896-4905.
- Selkoe DJ.** Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biol*. 2004; **6**: 1054-1061.
- Sergeant N, Delacourte A, Buee L.** Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; **1739**: 179-197.
- Sergeant N, David JP, Goedert M, Jakes R, Vermersch P, Buee L, Lefranc D, Wattez A, Delacourte A.** Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications. *J Neurochem*. 1997; **69**: 834-844.
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, Lee UMY.** Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem*. 1995; **270**: 18917-18922.
- Sergeant N, Bussi re T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A.** Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *NeuroReport*. 1995; **6**: 2217-2220.
- Shelton SB, Johnson GV.** Cyclin-dependant kinase-5 in neurodegeneration. *J Neurochem*. 2004; **88**: 1313-1326.
- Shimohama S.** Apoptosis in Alzheimer's disease : an update. *Apoptosis*. 2000; **5**: 9-16.

- Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV.** Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*. 1997; **6**: 751-763.
- Sironi JJ, Yen SH, Gondal JA, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Ser-262 in human recombinant tau protein is a markedly more favorable site for phosphorylation by CaMKII than PKA or PhK. *FEBS Lett*. 1998; **436**: 471-475.
- Skowryra D, Georgopoulos C, Zylicz M.** The E. coli dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell*. 1990; **62**: 939-944.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ.** Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999; **6**: 1067-1074.
- Song L, Zhou T, Jope RS.** Lithium facilitates apoptotic signaling induced by activation of the Fas death domain-containing receptor. *BMC Neurosci*. 2004; 5-20.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Bloom GS, Mumby MC.** A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle. *J Cell Biol*. 1995; **128**: 1131-1144.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL 3<sup>rd</sup>, Mumby MC, Bloom GS.** Molecular interactions among protein phosphatase 2A, Tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem*. 1999; **274**: 25490-25498.
- Sorenson CM.** Bcl-2 family members and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2004; **1644**: 169-177.
- Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Murell JR, Farlow MR, Ghetti B.** Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; **94**: 4113-4118.
- Spillantini MG, Goedert M.** Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*. 1998; **21**: 428-433.
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Scot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F.** Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol*. 1999; **155**: 2153-2165.
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M, Bruynseels K, Lasrado R, Vandezande K, Laenen I, Boon T, Van Lint J, Vandenheede J, Moechars D, Loos R, Van Leuven F.** Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem*. 2000; **275**: 41340-41349.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES.** FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 18542-18545.
- Stalder M, Phinney A, Probst A, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M.** Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol*. 1999; **154**: 1673-1684.

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

**Steele JC, Richardson J, Olszewski J.** Progressive supranuclear palsy. A heterogeneous degeneration involving brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze and pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia. *Arch Neurol.* 1964; 333-359.

**Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW.** Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *NeuroReport.* 1994; **5** : 2529-33.

**Su JH, Anderson AJ, Cribbs DH, Tu C, Tong L, Kesslack P, Cotman CW.** Fas and Fas ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in beta-amyloid-induced neuronal death. *Neurobiol Dis.* 2003; **12**: 182-193.

**Sugaya K, Reeves M, McKinney M.** Topographic associations between DNA fragmentation and Alzheimer's disease. *NeuroReport.* 1997; **5** : 2529-2533.

**Suh J, Lee YA, Gwag BJ.** Induction and attenuation of neuronal apoptosis by proteasome inhibitors in murine cortical cell cultures. *J Neurochem.* 2005; **95**: 684-694.

**Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G.** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999; **397**: 441-446.

**Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N.** Structure of Bax : coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell.* 2000 ; **103** : 645-654.

## T

**Takahashi M, Yasutake K, Tomizawa K.** Lithium inhibits neurite growth and tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta-dependent phosphorylation of juvenile tau in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1999; **73**: 2073-2083.

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

**Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S.** Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* 1995; **14**: 1129-1135.

**Tanaka T, Zhong J, Iqbal K, Trenkner E, Grundke-Iqbal I.** The regulation of phosphorylation of tau in SY5Y neuroblastoma cells: the role of protein phosphatases. *FEBS Lett.* 1998; **426**, 248-254.

**Tao W, Walter RJ, Berns MW.** Laser-transected microtubules exhibit individuality of regrowth, however most free new ends of the microtubules are stable. *J Cell Biol.* 1988; **107**: 1025-1035.

**Tarkowski E, Blennow K, Wallin A, Tarkowski A.** Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol.* 1999; **19**: 223-230.

**Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, Planel E, Sato S, Hashikawa T, Takashima A.** Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; **99**: 13896-13901.

**Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; **267**: 1456-1462.

**Thornberry NA.** Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*. 1998; **5**: R97-103.

**Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C.** Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1999; **269**: 52-54.

**Tomonaga M.** Ultrastructure of neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*. 1977; **37**: 177-181.

**Tong N, Sanchez JF, Maggirwar SB, Ramirez SH, Guo H, Dewhurst S, Gelbard HA.** Activation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) by platelet activating factor mediates migration and cell death in cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci*. 2001; **13**: 1913-1922.

**Trojanowski JQ, Lee VMY.** Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J*. 1995; **9**: 1570-1576.

**Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VMY.** Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem*. 1989; **37**: 209-215.

**Troost D, Aten J, Morsink F, De Jong JMBV.** Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis is not restricted to motor neurons. Bcl-2 expression is increased in unaffected post-central gyrus. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1995; **21**: 498.

**Tozser J, Bagosi P, Zahuczky G, Specht SI, Majerova E, Copeland TD.** Effect of caspase cleavage-site phosphorylation on proteolysis. *J Biochem*. 2003; **372**: 137-143.

**Tsujimoto Y, Croce CM.** Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; **83**: 5214-5218.

## U

**Uberti D, Cantarella G, Facchetti F, Cafici A, Grasso G, Bernardini R, Memo M.** TRAIL is expressed in the brain cells of Alzheimer's disease patients. *Neuroreport*. 2004; **15**: 579-581.

**Umeda Y, Taniguchi S, Arima K, Piao YS, Takahashi H, Iwatsubo T, Mann D, Hasegawa M.** Alterations in human tau transcripts correlate with those of neurofilament in sporadic tauopathies. *Neurosci Lett*. 2004; **359**: 151-154.

## V

**van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P.** Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*. 2001; **8**: 1136-1142.



**van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenaabeele P.** The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 2002 ; **9** : 20-26.

**Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D.** Targeted disruption of the mouse caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* 1998; **2**: 267-276.

**Vaux DL, Cory S, Adams JM.** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988; **335**: 440-442.

**Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL.** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to an antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000; **102**: 43-53.

**Vermersch P, Delacourte A, Javoy-Agid F, Hauw JJ, Agid Y.** Dementia in Parkinson's disease: biochemical evidence for cortical involvement using the immunodetection of abnormal tau proteins. *Ann Neurol.* 1993; **33**: 445-450.

**Vermersch P, Robitaille Y, Bernier L, Wattez A, Gauvreau D, Delacourte A.** Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: evidence for general cortical involvement. *Acta Neuropathol.* 1994; **87**: 572-577.

**Vermersch P, Bordet R, Ledoze F, Ruchoux MM, Chapon F, Thomas P, Destée A, Lechevalier B, Delacourte A.** Demonstration of a specific profile of pathological tau proteins in frontotemporal dementia cases. *CR Acad Sci.* 1995; **318**: 439-445.

**Volonte C, Rukenstein A.** Lithium chloride promotes short-term survival of PC12 cells after serum and NGF deprivation. *Lithium.* 1993; **4**: 211-219.

## W

**Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H.** Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci.* 2005; **99**: 307-321.

**Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nature Med.* 1996a ; **2**: 871-875.

**Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase-2A, -2B and -1. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996b; **38**: 200-208.

**Wang Y, Loomis PA, Zinkowski RP, Binder LI.** A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J Cell Biol.* 1993; **121**: 257-267.

**Wattenberg B, Lithgow T.** Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic.* 2001; **2**: 66-71.

**Wei ML, Andreadis A.** Splicing of regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J Neurochem.* 1998; **70**: 1346-1356.

**Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW.** A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; **72**: 1858-1862.

**White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, Steller H.** Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science*. 1994; **264**: 677-683.

**Williams RS, Harwood AJ.** Lithium therapy and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 2000; **21**: 61-64.

**Williamson R, Scales T, Clark BR, Gibb G, Reynolds CH, Kellie S, Bird IN, Varndell IM, Sheppard PW, Everall I, Anderton BH.** Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J Neurosci*. 2002; **22**: 10-20.

**Wyllie AH, Morris RG, Smith AL and Dunlop D.** Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*. 1984; **142**: 67-77.

## X

**Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, Nicholson DW.** Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J*. 1999; **18**: 2049-2056.

**Xie HQ, Johnson GV.** Calcineurin inhibition prevents calpain-mediated proteolysis of tau in differentiated PC12 cells. *J Neurosci Res*. 1998; **53**: 153-164.

## Y

**Yamamoto H, Saitoh Y, Fukunaga K, Nishimura H, Miyamoto E.** Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effect on microtubule assembly. *J Neurochem*. 1988; **50**: 1614-1623.

**Yamamoto H, Hasegawa M, Ono T, Tashima K, Ihara Y, Miyamoto E.** Dephosphorylation of fetal-tau and paired helical filaments-tau by protein phosphatases 1 et 2A and calcineurin. *J Biochem*. 1995; **118**: 1224-1231.

**Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Al-Mohanna F, Collison K, Zhu A, Stern E, Saido T, Tohyama M, Ogawa S, Roher A, Stern D.** An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1997; **389**: 689-695.

**Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997; **275**: 1129-1132.

**Yasojima K, McGeer E, McGeer P.** Tangles areas of Alzheimer brain have upregulated levels of exon 10 containing tau mRNA. *Brain Res*. 1999; **831**: 301-305.

**Yen SH, Liu WK, Hall FL, Yan SD, Stern D, Dickson DW.** Alzheimer neurofibrillary lesions : molecular nature and potential roles of different components. *Neurobiol aging*. 1995; **16**: 381-387.

**Z**

**Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G.** Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996; **183**: 1533-44.

**Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Pawlowski K, Godzik A, Reed JC.** BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; **97**: 2597-2602.

**Zhang J, Johnson GV.** Tau protein is hyperphosphorylated in a site-specific manner in apoptotic neuronal PC12 cells. *J Neurochem.* 2000; **75**: 2346-2357.

**Zheng-Fischhofer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E.** Sequential phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem.* 1998; **252**: 542-552.

**Zhivotovsky B, Hanson KP, Orrenius S.** Back to the future: the role of cytochrome c in cell death. *Cell Death Diff.* 1998; **5**: 459-460.

**Zhu X, Wang Y, Ogawa O, Lee HG, Raina AK, Siedlak SL, Harris PL, Fujioka H, Shimohama S, Tabaton M, Atwood CS, Petersen RB, Perry G, Smith MA.** Neuroprotective properties of Bcl-w in Alzheimer disease. *J Neurochem.* 2004 ; **89**: 1233-1240.

**Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB.** Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 2003 ; **162**: 59-69.

**Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X.** Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997; **90**: 405-413.

**Zou H, Li Y, Liu X, Wang X.** An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 11549-11556.

## **ANNEXES**

## ANNEXE 1

**Linking alterations in tau phosphorylation and cleavage during neuronal apoptosis.**

Armelle Rametti, Françoise Esclaire, Catherine Yardin, Faraj Terro.

J. Biol. Chem. (2004) vol 279; pp 54518-54528.

## ANNEXE 2

### **Lithium down-regulates tau expression in cultured cortical neurons: a possible mechanism of neuroprotection?**

Armelle Rametti, Françoise Esclaire, Catherine Yardin, Nadine Cogné, Faraj Terro.

Article soumis.

## RESUME

La maladie d'Alzheimer est une affection neurodégénérative caractérisée par une perte neuronale, qui serait apoptotique. Sur le plan neuropathologique, elle est caractérisée par la présence de deux lésions : les plaques amyloïdes, agrégats de peptides A $\beta$ , et les dégénérescences neurofibrillaires. Ces dernières présentent des filaments appariés en hélice, constitués principalement de protéines tau hyperphosphorylées. Les liens entre ces lésions et la perte neuronale restent mal connus. Parmi les enzymes impliquées dans la régulation de l'état de phosphorylation de tau, on note : la glycogène synthétase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) et la protéine phosphatase-2A (PP2A). Une dérégulation de l'activité de ces deux enzymes a été proposée comme facteur contribuant à la phosphorylation anormale de tau et de son agrégation dans la maladie. Par ailleurs, des données expérimentales ont démontré la survenue de modifications de l'état de phosphorylation de la protéine tau au cours de l'apoptose neuronale. De plus, une activation des caspases et un clivage de la protéine tau dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont été rapportés. Mais, l'étude de l'impact des modifications de l'état de phosphorylation de tau sur son clivage n'a pas été abordée. Ainsi, l'objectif de la première partie de ce travail était d'étudier les modifications de l'état de phosphorylation de la protéine tau au cours de l'apoptose neuronale et d'en déterminer l'impact sur son clivage et sur l'apoptose. Nos résultats démontrent qu'au cours de l'apoptose neuronale induite par la staurosporine, la protéine tau est tout d'abord hyperphosphorylée, puis déphosphorylée avant d'être clivée par les caspases et dégradée par les calpaïnes. La déphosphorylation et le clivage de tau peuvent être bloqués par l'inhibition de la PP2A par l'acide okadaïque. Une déphosphorylation préalable de tau par le lithium, un inhibiteur de la GSK-3 $\beta$ , augmente le clivage de tau et la sensibilité neuronale à l'apoptose induite par la staurosporine. Ces résultats indiquent que la déphosphorylation de tau est nécessaire pour que son clivage et sa dégradation puissent avoir lieu.

L'inhibition de la GSK-3 $\beta$  par le lithium a été proposée comme mécanisme moléculaire de neuroprotection. Le lithium est un médicament utilisé dans le traitement des troubles bipolaires. Les mécanismes moléculaires de son action thérapeutique restent à ce jour non élucidés. Quelques études sur des neurones en culture ont récemment démontré que la protéine tau peut « médier » l'apoptose, induite par le peptide A $\beta$ . Dans les modèles de souris transgéniques avec une tauopathie, il a été montré qu'après la suppression du variant de tau transgénique, on assistait à une récupération des capacités mnésiques. Ces résultats montrent qu'une diminution de la protéine tau peut être à l'origine de ces effets neuroprotecteurs. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque ce type de souris transgéniques sont traitées pendant une longue période au lithium. Cependant, les mécanismes de ces effets neuroprotecteurs du lithium n'ont pas été élucidés. Ainsi, le but de la deuxième partie du travail était de déterminer si le lithium module le niveau de protéine tau. Et si c'est le cas, quels sont les processus cellulaires responsables de cette modulation. Et enfin, est-ce que la modulation des niveaux de tau par le lithium est à l'origine ou est associée à une neuroprotection ? Nous montrons que l'exposition des cultures de neurones corticaux au lithium diminue la quantité de protéine tau. Cette diminution n'est pas liée à l'activation de processus protéolytiques ou à la perte neuronale, mais à une réduction de l'ARNm de tau. Cette diminution est également associée à une résistance des neurones à l'apoptose induite par le peptide A $\beta$ . Ces résultats suggèrent qu'une diminution de tau pourrait constituer un mécanisme de l'effet neuroprotecteur du lithium.

L'ensemble de nos travaux montre que l'absence de clivage et de dégradation de la protéine tau hyperphosphorylée pourrait mener à son accumulation dans les neurones en dégénérescence et, que le lithium pourrait exercer son action neuroprotective en régulant négativement tau et empêcher ainsi son accumulation intraneuronale.

**Mots clés** : protéine tau, apoptose, phosphorylation, clivage protéolytique, lithium, ARNm