

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiii
Avant-propos	xv
Chapitre 1 : Introduction	1
1. La protéine Tau	2
1.1 Historique	2
1.2 Structure et expression	2
1.3 Localisation	5
1.4 Fonctions	6
1.4.1 Fonctions de la protéine Tau axonale	6
1.4.2 Fonctions de la protéine Tau dendritique et nucléaire.....	9
1.4.3 Autres fonctions de Tau.....	9
1.5 Modifications post-traductionnelles	11
1.5.1 La phosphorylation	11
1.5.2 Autres modifications post-traductionnelles	14
1.6 Tauopathies	15
1.6.1 Étiologie.....	15
1.6.2 Agrégation de la protéine Tau	17
1.7 La maladie d'Alzheimer	18
1.7.1 Historique	18
1.7.2 Description.....	19
1.7.3 Symptômes	20
1.7.4 Diagnostic.....	21
1.7.5 L'amyloïde- β	23
1.7.6 La protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer.....	24
1.8 La maladie de Huntington	25
1.8.1 Description.....	25
1.8.2 Symptômes	26
1.8.3 Diagnostic.....	28
1.8.4 La protéine huntingtine.....	28

1.8.5 La protéine Tau dans la maladie de Huntington.....	29
2. Les méthodes de fixation.....	30
2.1 Fonctions.....	30
2.2 Types de fixation.....	32
2.2.1 Fixation physique.....	32
2.2.2 Fixation chimique.....	32
2.3 Mécanismes moléculaires.....	33
2.3.1 Cross-linking.....	33
2.3.2 Dénaturation.....	34
2.4 Fixateurs utilisés en laboratoire.....	35
2.2.1 Les aldéhydes.....	35
2.2.2 Les solvants organiques.....	36
2.3.3 Autres fixateurs.....	36
Hypothèses et objectifs.....	37
1. Hypothèses.....	37
2. Objectif général.....	38
2.1 Premier objectif.....	39
2.2 Deuxième objectif.....	39
Chapitre 2 : Comparaison de différentes méthodes de préparation pour l'étude de la protéine Tau par immunohistochimie.....	40
Comparison of various preparation methods for the study of tau protein phosphorylation by immunohistochemistry in paraffin-embedded sections.....	41
1. Résumé.....	42
2. Abstract.....	43
3. Introduction.....	44
4. Material and Methods.....	46
4.1 Animals.....	46
4.2 Fixation.....	46
4.3 Immunohistochemistry.....	47
4.4 Immunofluorescence.....	48
5. Results.....	50
5.1 Fixation with Bouin at 4°C is more effective to visualize tau in WT mice.....	50
5.2 Bouin at 4°C allows better preservation of tau phosphorylation.....	52
5.3 Perfusion affects tau phosphorylation.....	59
6. Discussion.....	61
7. Acknowledgment.....	64
8. Competing interests.....	64
9. Author Contributions.....	64

Chapitre 3 : Étude de la phosphorylation et de l'épissage alternatif de la protéine Tau humaine dans la maladie de Huntington	65
1. Résumé	66
2. Introduction	68
3. Matériel et méthodes	70
3.1 Échantillons humains	70
3.2 Extraction protéique (fractions soluble et acide formique)	71
3.3 Extraction protéique (fraction Sarkosyl)	71
3.4 Immunobuvardage	72
3.5 Dot blot	73
3.6 Détermination de la variation d'épissage de l'exon 10 de la protéine Tau	74
3.7 Statistiques	74
4. Résultats	75
4.1 L'hyperphosphorylation de Tau survient dans les stades avancés de la MH	75
4.2 Épissage alternatif aberrant de l'exon 10 de la protéine Tau dans la MH	79
5. Discussion	81
5. Matériel supplémentaire	85
Chapitre 4 : Discussion et perspectives.....	90
1. Retour sur les résultats et limites des études	91
1.1 Comparaison de différentes méthodes de préparation pour l'étude de la protéine Tau par immunohistochimie	91
1.2 Étude de la phosphorylation et de l'épissage alternatif de la protéine Tau dans la maladie de Huntington.....	95
2. Perspectives	100
Conclusion	102
Bibliographie.....	103

Liste des tableaux

Tableau 1. Les principales Tauopathies.	16
Tableau 2. Grades de Vonsattel dans la maladie de Huntington.	28
Tableau 3. Caractéristiques des individus des échantillons post-mortem.....	72
Tableau 4. Anticorps utilisés dans cette étude.	74
Tableau supplémentaire 1. Détails démographiques des individus contrôles.....	86
Tableau supplémentaire 2. Détails démographiques des individus atteints de la MH.....	88

Liste des figures

Figure 1. Le gène humain <i>MAPT</i> et les isoformes épissés de la protéine Tau dans le cerveau humain.....	3
Figure 2. Stabilisation des microtubules par la protéine Tau	7
Figure 3. Sites de phosphorylation de la protéine Tau.....	12
Figure 4. Total Tau staining by fluorescence in WT mice.....	52
Figure 5. Total Tau staining by DAB in WT mice.....	53
Figure 6. PHF1 staining by DAB in perfused WT mice.....	54
Figure 7. Observation of Tau phosphorylation in condition of hyperphosphorylation...	56
Figure 8. Post-mortem dephosphorylation as a function of time	57
Figure 9. CP27 staining by DAB in hTau and TKO mice.....	58
Figure 10. CP13 staining by DAB in hTau and TKO mice.....	59
Figure 11. PHF1 staining by DAB in hTau and TKO mice.....	60
Figure 12. Observation of the effect of perfusion on phosphorylation in transgenic mice	61
Figure 13. La phosphorylation de Tau augmente avec la progression de la maladie de Huntington (MH).....	77
Figure 14. La phosphorylation de la protéine Tau insoluble augmente dans la MH.....	79
Figure 15. Défauts d'épissage alternatif de la protéine Tau dans la MH.....	81
Figure 16. Représentation schématique des voies de signalisation par lesquelles la mHtt induirait une pathologie Tau dans la maladie de Huntington.....	100

Liste des abréviations

α -Syn	α -synucléine
A β	Peptide β -amyloïde
AD	<i>Alzheimer's disease</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C ou CTL	Contrôles
CAGn	Nombre de répétitions CAG
CaMKII	<i>Ca²⁺- or calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CDK5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
CHIP-HSP90	<i>C-terminus HSP70-interacting protein-heat shock protein 90</i>
C-terminal	Extrémité carboxy-terminale
DAB	Tetrahydrochlorure de 3,3' diaminobenzidine
DAPI	4,6' diamidino-2-phénylindole
DTT	Dithiothréitol
E1 à E16	Exon 1 à exon 16
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FA	Acide formique
FPN	Ferroportine
FTDP-17	<i>Frontotemporal dementia with parkinsonism-17</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
HD	<i>Huntington's disease</i>
HD2	<i>Huntington's disease, grade 2 de Vonsattel</i>
HD3	<i>Huntington's disease, grade 3 de Vonsattel</i>
HD4	<i>Huntington's disease, grade 4 de Vonsattel</i>
HIER	<i>Heat-induced antigen retrieval</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hTau	<i>Human Tau</i>
Htt	Huntingtine
IPM	Intervalle post-mortem
JIP1	<i>JNK-interacting protein 1</i>
LTD	<i>Long-term depression</i>
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
Lys	Lysine
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	<i>Microtubule-associated protein</i>
MAPT	<i>Microtubule-associated protein Tau</i>
MARK	<i>Microtubule affinity-regulating kinase</i>
MH	Maladie d'Huntington

mHtt	Huntingtine mutante
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
NFT	<i>Neurofibrillary tangle</i>
NINCDS-ADRDA	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
N-terminal	Extrémité amino-terminale
P301S	Mutation de la protéine Tau humaine sur l'acide aminé 301
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline-Tween 20</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PHF	<i>Paired helical filament</i>
PKA	<i>Cyclic AMP-dependent protein kinase</i>
PP1	Protéine phosphatase 1
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PP2B	Protéine phosphatase 2B (ou calcineurine)
PP2C	Protéine phosphatase 2C
PP5	Protéine phosphatase 5
PS1	Préséniline 1 (gène)
PSEN1	Préséniline 1 (protéine)
PSEN2	Préséniline 2 (protéine)
RT	<i>Room temperature</i>
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
Scn1a	Sous-unité alpha du canal ionique sodium voltage-dépendant
Ser	Sérine
SRK	Sarkosyl
SRSP6	<i>Serine/arginine-rich splicing factor-6</i>
Tau 3R	Tau avec 3 domaines de répétition
Tau 4R	Tau avec 4 domaines de répétition
Tau 0N	Tau sans insert
Tau 1N	Tau avec un seul insert
Tau 2N	Tau avec deux inserts
TDP-43	<i>TAR DNA-binding protein 43</i>
Thr	Thréonine
Tyr	Tyrosine
TKO	<i>Tau knock-out</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween 20</i>
WT	<i>Wild-type</i>
3'-UTR	<i>3'-untranslated region</i>
5'-UTR	<i>5'-untranslated region</i>

*À ma famille, Alain, Louise et Marc-André, pour tout l'amour qu'ils m'ont donné.
À Nicolas, pour son amour, sa patience et son soutien tout au long de ma maîtrise.*

À la mémoire de mon grand-père Adrien et de ma tante Mireille.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Emmanuel Planel, ainsi que mon codirecteur Dr Sébastien Hébert, de m'avoir accueillie dans leur laboratoire il y a deux ans. Merci pour vos précieux conseils, votre patience et pour votre confiance à mon égard. Merci également pour les congrès auxquels j'ai pu assister et participer.

Je désire remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Je souhaite aussi remercier les professionnelles de recherche qui m'ont épaulée tout au long de ma maîtrise, Françoise Morin et Claudia Goupil. Votre expertise scientifique et votre disponibilité pour répondre à mes questions m'ont grandement aidé lors de mon séjour au laboratoire.

Je remercie tous les membres du laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : Maud Gratuze, Franck Petry, Laura Eyoum Jong, Isabelle Guisle, Ophélie Lerdu, Sara Rainone, Emmanuelle Boscher, Julia Hernandez-Rapp et Isabelle St-Amour. Non seulement j'ai eu la chance de vous avoir comme collègues, mais j'ai aussi eu la chance de développer des liens d'amitié auprès de la plupart d'entre vous. Un merci tout spécial à Maud et Julia pour m'avoir supervisée au laboratoire et m'avoir enseignée ce qu'était la rigueur scientifique. Je remercie aussi Mélody, Nicolas, Mathilde, Anne, Léa, Baya et Marie-Kim pour la joie que vous m'avez apportée pendant ces deux années.

Je voudrais également remercier le Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS) de m'avoir octroyé une bourse me permettant de poursuivre ma maîtrise. J'aimerais aussi souligner le travail des techniciens et techniciennes en santé animale de l'animalerie du CHUL qui ont pris soin de nos souris. Je voudrais souligner le travail de Johanne Ouellet, du service d'histologie du CHU (CHUL), qui a procédé à toutes les coupes de cerveaux en paraffine sur lame.

De plus, je voudrais remercier mes parents pour leur support tout au long de ces années et pour leurs encouragements à persévérer sans cesse. Votre intérêt et votre enthousiasme pour mes projets m'ont motivée à continuer et m'ont montré que j'étais dans la bonne voie. Merci pour tous les sacrifices que vous avez faits et merci d'avoir toujours été présents pour moi. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir appuyée toutes ces années. Merci également à mon frère, Marc-André, pour ta présence, ton éternelle bonne humeur, ta curiosité pour mes recherches et tes blagues qui me remontent le moral.

Enfin, un immense merci à mon amoureux, Nicolas, qui m'a soutenu tout le long de ma maîtrise et qui m'a encouragé à chaque jour. Malgré mes moments d'angoisse ou mes pleurs, tu as su être là quand j'en avais besoin, et dans les moments difficiles, tu m'as toujours réconfortée et poussée à continuer. Merci d'avoir eu confiance en moi et en mes capacités. Je salue ta patience légendaire. Merci pour tout.

Avant-propos

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire sont le fruit de deux années d'efforts dans le cadre de ma maîtrise. Durant cette période, j'ai eu l'occasion de participer à trois différents manuscrits. Dans ce mémoire, seul un de ces articles, directement en lien avec mon sujet principal, sera inclus comme chapitre.

Le premier chapitre de ce mémoire est une revue de littérature permettant d'introduire les différents concepts abordés lors de ma maîtrise. Le chapitre 2 est présenté sous forme d'article qui est présentement soumis pour publication et le chapitre 3 exposera mes résultats provenant d'un article déjà publié.

Le premier article a pour but de comparer différentes méthodes de fixation de cerveaux murins selon différents paramètres pour l'observation de la phosphorylation de la protéine Tau par immunohistochimie et immunofluorescence.

Comparison of various preparation methods for the study of Tau protein phosphorylation by immunohistochemistry in paraffin-embedded sections. **Turgeon A**, Gratuze M, Morin F, Hébert SS, Planel E. Soumis à PLOS ONE le 10 avril 2018.

L'élaboration du projet a été faite par Dr Emmanuel Planel. Pour les souris *wild-type* (WT), j'ai procédé à la prise de température des souris, la prise de poids et le sacrifice des souris. La perfusion des souris a été effectuée avec l'aide de M. Gratuze et cette dernière a aussi réalisé la récupération rapide des cerveaux. Pour les souris Tau *knock-out* (TKO) et avec Tau humaine (hTau), F. Morin a procédé à la prise de température, la prise de poids et le sacrifice des souris. J'ai effectué la récupération des cerveaux. J'ai exécuté les techniques d'immunohistochimie et d'immunofluorescence. J'ai effectué les analyses et l'interprétation des résultats, la préparation des figures et la rédaction de la première

version de l'article sous la supervision du Dr Planel. Cet article a été soumis à PLOS ONE le 10 avril 2018.

Article non inclus dans le mémoire

J'ai participé à deux autres articles pendant ma maîtrise. Le premier d'entre eux a pour but d'étudier la présence de plusieurs protéinopathies dans la maladie de Huntington chez l'humain, comme les protéines Tau, amyloïde- β (A β 40 et A β 42), huntingtine (Htt), *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43) et l'alpha-synucléine (α -syn). Mes résultats provenant de cet article feront l'objet du chapitre 3 de mon mémoire.

Co-occurrence of mixed proteinopathies in late-stage Huntington's Disease. St-Amour I, **Turgeon A**, Goupil C, Planel E, Hébert SS. *Acta Neuropathol.* 2018 Feb;135(2):249-265. doi: 10.1007/s00401-017-1786-7

L'élaboration du projet a été faite par Dr. Sébastien Hébert. Les extractions protéiques et d'ARN ont été exécutées par I. St-Amour, ainsi que les expériences pour les protéines huntingtine, A β 40 et A β 42, α -synucléine et TDP-43. La RT-PCR a été réalisée par C. Goupil. J'ai effectué les Western blots ainsi que les dot blots pour la partie concernant la protéine Tau pour les fractions lyse, Sarkosyl et acide formique. J'ai aussi réalisé les PCR de l'épissage alternatif de l'exon 10 de Tau, soit Tau 3R et Tau 4R. J'ai contribué à l'écriture de la partie «Matériel et méthodes» et j'ai fait la quantification des résultats de Tau, l'analyse des résultats obtenus et la préparation des figures pour cette protéine. Cet article a été publié en 2018 dans le journal *Acta Neuropathologica*.

Chapitre 1 : Introduction

1. La protéine Tau

1.1 Historique

La protéine Tau a été isolée et décrite par Weingarten et ses collaborateurs en 1975, alors qu'ils la décrivaient comme une protéine résistante à la chaleur qui facilitait la polymérisation des microtubules (Weingarten et al., 1975). Cette découverte a pu avoir lieu grâce au développement des procédés de polymérisation de la tubuline *in vitro*. Cette protéine était alors appelée facteur Tau pour sa capacité à induire la formation de microtubules. Elle a été classée dans la famille des MAPs (*microtubule-associated protein*) et on doit attendre en 1985 avant de découvrir qu'elle est une composante des enchevêtrements neurofibrillaires (*neurofibrillary tangles*, NFTs) retrouvés dans la maladie d'Alzheimer (Cleveland et al., 1977; Brion et al., 1985).

1.2 Structure et expression

La protéine Tau humaine est encodée par le gène *MAPT* (*microtubule-associated protein Tau*) situé sur le chromosome 17q21. Ce gène comporte 16 exons : les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs, alors que les exons 2, 3 et 10 peuvent être épissés alternativement dans le cerveau humain, menant à l'existence de six isoformes (Neve et al., 1986). La nature de ces isoformes dépend du nombre d'inserts amino-terminal (N-terminal) encodés par les exons 2 et 3 et par leur nombre de domaines de répétition carboxy-terminal (C-terminal). Les isoformes contenant 0, 1 ou 2 inserts de 29 résidus N-terminal sont nommés respectivement 0N, 1N ou 2N, et ceux contenant 3 ou 4 domaines de répétition C-terminal sont nommés 3R ou 4R. Le deuxième domaine de répétition R2 se retrouvant au niveau de l'exon 10, l'exclusion de cet exon mène à la formation de l'isoforme 3R (Lee et al., 1988) (figure 1).

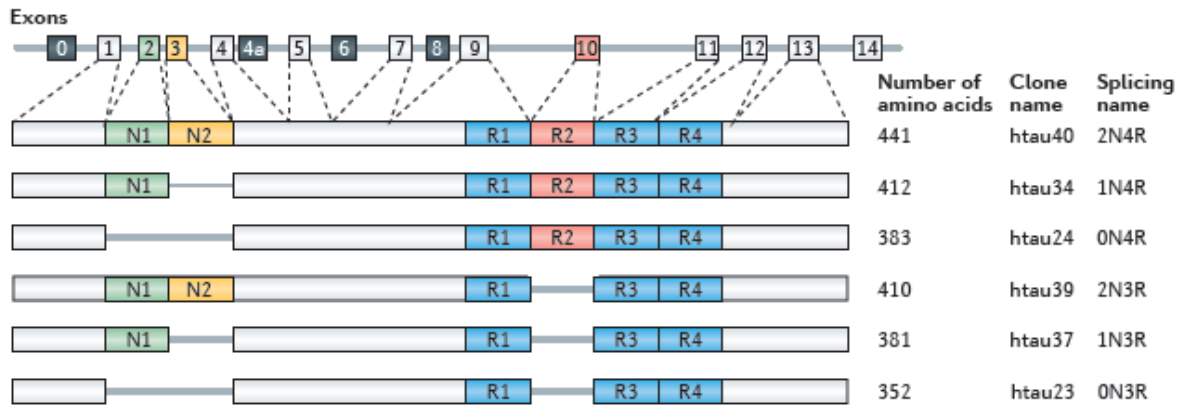


Figure 1. Le gène humain *MAPT* et les isoformes épissés de la protéine Tau dans le cerveau humain. Schéma du gène *MAPT* possédant 16 exons (0 à 16). Le nombre d'inserts N-terminaux (N1 et N2) et de domaines de répétition (R1 à R4) sont représentés pour chacun des isoformes de Tau, avec le nombre d'acides aminés, le nom du clone et le nom d'épissage correspondants (Wang and Mandelkow, 2016).

MAPT, le gène codant pour la protéine Tau humaine, contient 16 exons. Les exons 1 (E1), E4, E5, E7, E9, E11, E12 et E13 sont constitutifs, tandis que les autres, soit E2, E3 et E10, sont sujets à l'épissage alternatif. E0 et E1 codent les séquences non traduites en 5' (5'-*untranslated region*, 5'-UTR) de l'ARNm de *MAPT*, tandis que E14 fait partie de la région non traduite en 3' (3'-*untranslated region*, 3'-UTR). E0 fait partie du promoteur, lequel est transcrit mais non traduit. Le codon d'initiation de la traduction ATG est situé dans E1. E4a, E6 et E8 sont transcrits seulement dans les tissus périphériques. Les six isoformes de la protéine Tau du cerveau humain sont générés par l'épissage alternatif de E2, E3 et E10 (Andreadis, 2006). Ces isoformes de Tau diffèrent selon la présence de 0, 1 ou 2 inserts près de la partie amino-terminale (0N, 1N et 2N, respectivement) et la présence de la répétition R2, menant à des espèces de Tau ayant 3 ou 4 domaines de répétition carboxy-terminal (3R et 4R, respectivement). L'expression de la protéine Tau humaine est régulée dans le développement : dans le cerveau adulte, six isoformes de Tau sont exprimés, tandis que dans le cerveau fœtal, seulement la plus courte Tau est exprimée. Dans le cerveau adulte humain, les niveaux des formes 3R et 4R sont approximativement égaux et l'isoforme 2N est sous-représenté comparé aux autres : les isoformes de Tau 0N, 1N et 2N constituent respectivement ~37%, ~54% et ~9% de la proportion de Tau totale (Goedert and Jakes, 1990). L'expression de Tau dans le cerveau humain montre des variations

régionales considérables. L'ARNm et les niveaux protéiques de Tau dans le néocortex sont deux fois plus élevés que ceux dans la matière blanche et le cervelet (Trabzuni et al., 2012). L'épissage de *MAPT* montre aussi des différences régionales : par exemple, le niveau de Tau 0N3R est plus bas dans le cervelet que dans les autres régions (Boutajangout et al., 2004; Trabzuni et al., 2012). Cette variation de l'expression de Tau pourrait contribuer à la vulnérabilité différentielle des régions du cerveau à la pathologie Tau (Wang and Mandelkow, 2016).

La forme 4R possède une plus grande affinité pour les microtubules que la forme 3R en raison de son domaine de répétition supplémentaire R2, ce qui la rend plus efficace à promouvoir l'assemblage des microtubules (Goedert and Jakes, 1990). Certaines Tauopathies ont été associées à un dysfonctionnement de l'épissage alternatif au niveau de l'exon 10, permettant ou non la présence de 3 ou de 4 domaines de liaison aux microtubules. Les Tauopathies peuvent donc être classées en trois groupes selon le type d'isoformes retrouvés au niveau des agrégats : les Tauopathies 3R, les Tauopathies 4R et les Tauopathies 3R et 4R (Dickson et al., 2011).

Des études ont démontré que l'inclusion d'un insert promeut l'agrégation de la protéine Tau, tandis que l'inclusion du deuxième insert permet de retarder son agrégation (Zhong et al., 2012). Les deux inserts de la partie N-terminale font partie du domaine de projection de la protéine Tau, qui pourrait avoir un rôle dans l'espacement ou l'attachement des microtubules avec d'autres composantes de la cellule (Chen et al., 1992; Frappier et al., 1994). De plus, puisque les formes 0N, 1N et 2N ont des distributions cellulaires distinctes, ces deux inserts pourraient potentiellement avoir un rôle dans la localisation cellulaire de Tau dans les neurones (Liu and Gotz, 2013). Toutefois, la fonction exacte de ces inserts demeure incertaine.

1.3 Localisation

Dans le cerveau, la protéine Tau est principalement retrouvée dans les neurones, mais elle est aussi présente dans la glie, principalement en conditions pathologiques (Chin and Goldman, 1996) et à l'extérieur des cellules (LoPresti et al., 1995). La distribution de Tau dans différents compartiments est régulée lors du développement (Drubin et al., 1984). Cette protéine est aussi distribuée dans les neurites et le corps cellulaire des neurones immatures. Lors de la croissance des axones et de la polarisation des neurones, elle devient enrichie dans les axones et retrouvée en infime quantité dans les dendrites et le noyau (Papasozomenos and Binder, 1987; Sultan et al., 2011). L'ARNm de Tau est distribué plutôt vers les axones proximaux par un signal de localisation axonale situé dans le 3'-UTR (Litman et al., 1993; Aronov et al., 2001). Cet ARNm est préférentiellement traduit dans les axones (Morita and Sobue, 2009) et plusieurs facteurs peuvent contribuer à la localisation axonale de Tau. Parmi ces facteurs, on retrouve une plus forte affinité de Tau pour les microtubules dans les axones que ceux dans les dendrites, une demi-vie de Tau plus courte dans le compartiment somatodendritique que dans les axones (Hirokawa et al., 1996), un transport axonal de Tau rapide après sa synthèse dans le corps cellulaire (Kosik et al., 1989a) et une barrière axonale empêchant le transport rétrograde de Tau vers les dendrites (Li et al., 2011). De plus, dans les neurones, en plus de s'associer aux microtubules, Tau peut aussi s'associer à la membrane plasmique dans une interaction qui peut être modulée par sa phosphorylation (Brandt et al., 1995; Arrasate et al., 2000; Avila et al., 2002).

La protéine Tau est, de manière prédominante, une protéine intracellulaire, mais elle peut être relâchée physiologiquement dans l'espace extracellulaire. La protéine tronquée au niveau N-terminal est retrouvée notamment dans le liquide céphalo-rachidien humain (Johnson et al., 1997), tandis que la protéine de longueur intégrale a été retrouvée dans le liquide interstitiel cérébral (Yamada et al., 2011). Celle retrouvée dans le liquide interstitiel cérébral est sujette à entrer dans les cellules et être dégradée localement ou être drainée dans l'espace périvasculaire. Il est aussi possible de détecter des protéines et de l'ARNm de Tau dans plusieurs organes et tissus périphériques tels que le cœur, les reins, les poumons, les muscles, le pancréas, les testicules et les fibroblastes (Gu et al., 1996; Ingelson et al.,

1996; Vanier et al., 1998). On retrouve également la présence d'antigènes nucléaires réagissant avec les anticorps dirigés contre Tau dans les cellules en prolifération.

La protéine Tau semble être phosphorylée dans le cytosol avant d'être transportée au noyau (Greenwood and Johnson, 1995; Sotiropoulos et al., 2017). Dans les neurones en développement, sa phosphorylation influencerait sa distribution. En effet, la protéine phosphorylée sur sa région riche en acide aminé proline est surtout présente dans le compartiment somatodendritique, alors que lorsque cette région est déphosphorylée, on retrouve Tau plutôt dans la région distale de l'axone (Dotti et al., 1987; Mandell and Banker, 1996). La présence de Tau dans cette dernière région est retrouvée aussi lorsqu'elle est phosphorylée dans son domaine C-terminal (Dotti et al., 1987).

La mauvaise distribution de Tau dans les dendrites est un des principaux signes de neurodégénérescence. Les différents isoformes de Tau étant aussi distribués dans des compartiments distincts (Liu and Gotz, 2013), l'importance de la bonne localisation de la protéine est probablement liée à différentes fonctions dans différents compartiments, et une perturbation de ce triage pourrait induire un gain de fonction toxique contribuant à la neurodégénérescence.

1.4 Fonctions

1.4.1 Fonctions de la protéine Tau axonale

La protéine Tau étant axonale, elle interagit surtout avec le cytosquelette, spécifiquement avec les microtubules par son domaine de liaison aux microtubules. Elle stabilise ainsi les microtubules et leur assemblage par les monomères de tubuline, en plus de jouer un rôle dans la régulation de l'instabilité dynamique des microtubules permettant le réarrangement du cytosquelette (Feinstein and Wilson, 2005; Mandelkow and Mandelkow, 2012) (figure 2). Ce réarrangement est possible par la liaison de Tau à l'interface entre les hétérodimères de α -tubuline et de β -tubuline par de petites séquences d'acides aminés situées dans son domaine de liaison aux microtubules. Les résidus 224 à 237, 245 à 253, 275 à 284 et 300 à

317 se lie aux hétérodimères, tandis que les autres résidus situés entre ces derniers restent flexibles (Kadavath et al., 2015). Tau possède deux motifs d'hexapeptides au niveau des résidus 269-284 et 300-310 qui peuvent former une conformation d'épingle à cheveux lorsqu'elle est liée aux microtubules (Kadavath et al., 2015). Ces motifs d'hexapeptides sont essentiels pour l'agrégation de la protéine, et ainsi la stabilisation de la conformation de Tau liée aux microtubules pourrait retarder son agrégation. Les domaines de projections de Tau déterminent l'espacement entre les microtubules des axones et peuvent donc augmenter le diamètre axonal (Chen et al., 1992).

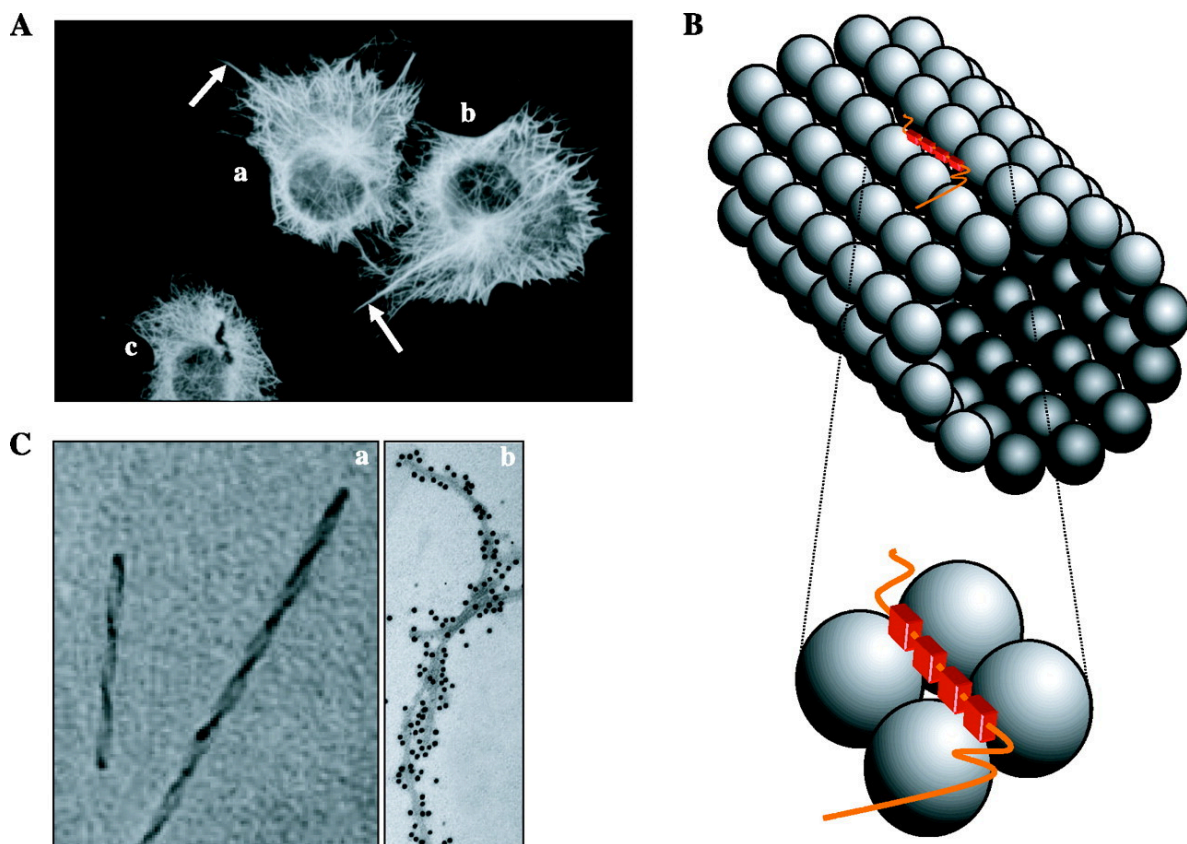


Figure 2. Stabilisation des microtubules par la protéine Tau. Tau est une protéine associée aux microtubules qui stabilise ces derniers et qui est capable de s'agréger en conditions pathologiques. (A) L'expression ectopique de Tau dans les cellules non neuronales (a et b) promeut la stabilisation des microtubules, menant à la formation d'extensions cytoplasmiques (flèches) qui ne sont normalement pas présentes dans les cellules n'exprimant pas Tau (c). (B) Schéma montrant Tau (en rouge) comme protéine associée aux microtubules (le microtubule est représenté par un cylindre, haut). À noter que la grandeur de la molécule Tau est exagérée comparativement à celle du microtubule. Une illustration de la liaison de Tau à un dimère de tubuline formant les microtubules (bas) est

également indiquée. (C) En conditions pathologiques (comme dans la maladie d'Alzheimer), la protéine Tau peut former des filaments aberrants (a). Les anticorps dirigés contre la protéine Tau peuvent se lier aux filaments (b). Tiré de (Avila et al., 2004).

La protéine Tau pourrait aussi avoir une fonction dans la régulation du transport axonal en interférant avec les fonctions des protéines motrices qui transportent les cargos le long des microtubules, soit la dynéine, transportant des cargos vers le corps cellulaire (extrémité moins) et la kinésine, qui transporte les cargos vers la terminaison de l'axone (extrémité plus) (Stamer et al., 2002). Ces deux protéines se lient, tout comme Tau, aux microtubules, provoquant une compétition avec Tau qui se lie elle aussi aux microtubules. La fréquence de liaison et la longueur du trajet de la dynéine et de la kinésine sont ainsi diminuées, ce qui ralentit le transport rétrograde et antérograde (Dixit et al., 2008). La compétition de Tau avec les protéines motrices peut engendrer une diminution du nombre de ces protéines liant les cargos et interférer avec leur transport axonal (Vershinin et al., 2007). Puisque Tau a un effet inhibiteur plus prononcé sur la kinésine que sur la dynéine, sa surexpression provoque au final une accumulation de cargos dans le soma. En agissant aussi comme cargo, elle peut faire compétition à d'autres cargos livrés par la kinésine et affecter le transport axonal de ceux-ci (Utton et al., 2005; Konzack et al., 2007). De plus, Tau peut activer la protéine phosphatase 1 (PP1) et la glycogène synthase kinase 3 β (GSK-3 β) par sa partie N-terminale, causant le relâchement des vésicules cargos liées aux kinésines (Kanaan et al., 2011). Elle peut également lier la sous-unité p150 de la dynactine, une protéine multimérique activant la dynéine, et rendre plus facile l'association des microtubules avec la dynactine et ainsi faciliter le transport par la dynéine (Magnani et al., 2007). Tandis que ces rôles ont cependant été démontrés *in vitro*, la surexpression ou la délétion de Tau *in vivo* influence peu le transport axonal, indiquant que des mécanismes pourraient compenser l'impact de cette protéine dans le transport axonal (Yuan et al., 2008).

Tau pourrait aussi avoir un rôle dans la maturation et l'élongation des axones. En effet, sa surexpression permet la formation de neurites au sein de cellules non neuronales, tandis que sa suppression dans les neurones de rat en culture inhibe la formation de neurites (Caceres and Kosik, 1990; Knops et al., 1991; Dawson et al., 2001; Yoshizaki et al., 2004).

1.4.2 Fonctions de la protéine Tau dendritique et nucléaire

La protéine Tau est majoritairement axonale, mais une infime quantité se retrouve physiologiquement dans les dendrites, et pourrait aussi être retrouvée dans les épines dendritiques (Ittner et al., 2010). La fonction de Tau dans les dendrites n'est pas bien caractérisée, mais elle pourrait être impliquée dans la régulation de la plasticité synaptique. Effectivement, dans les neurones de souris en culture et dans des coupes d'hippocampe, une activation pharmacologique des synapses provoque un changement de localisation de la protéine Tau endogène, de l'arborisation dendritique vers les compartiments postsynaptiques.

Tau a aussi été observée dans le noyau de cellules neuronales, comme les cellules de neuroblastome humain, et non neuronales, comme les fibroblastes humains (Loomis et al., 1990; Sjoberg et al., 2006). Des agrégats de Tau en forme de bâtonnets ont d'ailleurs été observés dans le noyau de neurones dans les maladies d'Alzheimer et de Huntington (Fernandez-Nogales et al., 2014). Cette protéine nucléaire semble être impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'ADN génomique, de l'ARN nucléaire et de l'ARN cytoplasmique dans des conditions physiologiques et des conditions de stress hyperthermique *in vivo* ainsi que dans les neurones en culture (Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014).

1.4.3 Autres fonctions de Tau

Tau pourrait interagir avec l'actine pour former des faisceaux de filaments d'actine bien alignés et pourrait alors modifier l'organisation du cytosquelette (Whiteman et al., 2009). L'association de l'actine avec Tau pourrait être altérée par la phosphorylation de cette dernière. La protéine Tau, lorsque ses motifs KXGS situés dans le domaine de répétition sont phosphorylés, a tendance à colocaliser avec les filaments d'actine dans les inclusions en bâtonnets d'actine et de cofiline ainsi que dans les cônes de croissance pendant le développement (Biernat et al., 2002).

La protéine Tau aurait un rôle dans la plasticité synaptique. Dans la région CA1 de l'hippocampe de souris ayant un *knock-out* pour Tau (*Tau-knockout mice*, TKO), un déficit dans la dépression à long terme (*long-term depression*, LTD) mais pas dans la potentialisation à long terme (*long-term potentiation*, LTP) a été observé (Kimura et al., 2014). Une autre étude a cependant montré l'inverse, soit un déficit de la LTP et non de la LTD dans les souris TKO (Ahmed et al., 2014). La méthode utilisée peut peut-être provoquer une différence entre les résultats, mais la plasticité synaptique semble néanmoins atteinte dans ce modèle déficient en Tau.

De plus, de récentes études ont démontré que les souris déficientes en protéine Tau subissaient de sévères changements pathologiques. D'abord, une déficience génétique en Tau protège contre l'excitotoxicité causée par l'amyloïde- β , une protéine retrouvée sous forme de plaques extracellulaires dans la maladie d'Alzheimer, dans les souris surexprimant la protéine précurseur de l'amyloïde (*amyloid precursor protein*, APP) humaine (Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010). Cette protection peut également être retrouvée dans les souris exprimant l'APP et la préséniline 1 (PS1) humaine (Leroy et al., 2012), dans les souris exprimant le gène mutant *Scn1a*, un gène codant pour la sous-unité du canal sodique voltage-dépendant Nav1.1 (Gheyara et al., 2014), ainsi que dans les souris où la sous-unité du canal potassique voltage-dépendant Kv1.1 est manquante (Holth et al., 2013). Ces études indiquent donc que la protéine Tau aurait un rôle dans l'hyperexcitabilité pathologique et qu'elle joue un rôle important dans la régulation de l'activité neuronale.

Une déficience en protéine Tau pourrait également causer une accumulation de fer à l'intérieur des neurones. Une étude a démontré une perte neuronale dans la substance noire, une accumulation de fer à l'intérieur des neurones ainsi qu'un déclin sévère des fonctions locomotrices dans les souris TKO âgées de 12 mois (Lei et al., 2012). La déficience en Tau causerait l'accumulation de fer en empêchant le transport de l'APP à la surface de la cellule, où APP interagit normalement avec la ferroportine (FPN) pour faciliter l'exportation du fer. Cette déposition a été observée notamment dans les régions du cerveau comme le cortex dans la maladie d'Alzheimer (MA), la substance noire dans la maladie de

Parkinson ainsi que plusieurs autres régions dans différentes Tauopathies, où les niveaux de Tau soluble sont réduits (Lei et al., 2012).

1.5 Modifications post-traductionnelles

1.5.1 La phosphorylation

La phosphorylation de Tau est régulée au cours du développement. La protéine Tau fœtale contient environ 7 phosphates par molécule tandis que la protéine Tau chez l'adulte contient environ 2 phosphates par molécule, la protéine fœtale subissant donc beaucoup plus de modifications que chez l'adulte (Kanemaru et al., 1992). L'hyperphosphorylation de Tau est provoquée par une augmentation de la phosphorylation sur des sites qui sont normalement phosphorylés physiologiquement. Cette situation est produite par une augmentation du nombre de protéines Tau phosphorylées ou du nombre de groupements phosphates par molécules, qui est de 3 à 8 fois plus élevé en conditions pathologiques (Ksiezak-Reding et al., 1992). Dans la MA, Tau devient hyperphosphorylée et peut contenir 8 phosphates par molécule (Kopke et al., 1993). Cependant, lors de ces études, les cerveaux obtenus ont été étudiés lors de l'autopsie. L'intervalle post-mortem (IPM) entraîne une déphosphorylation de la protéine Tau soluble par les phosphatases, ce qui signifie que ce chiffre peut être encore plus élevé (Matsuo et al., 1994). La protéine Tau humaine dans le cerveau adulte est phosphorylée à la plupart des mêmes sites que les filaments hélicoïdaux appariés (*paired helical filaments*, PHFs), signifiant qu'une phosphorylation excessive au niveau de ces sites est pathologique (Morris et al., 2015).

Il existe 85 sites potentiels de phosphorylation sur l'isoforme le plus long de Tau (2N4R). Parmi ces sites, on retrouve notamment 80 sérines (Ser) ou thréonines (Thr) et 5 tyrosines (Tyr), dont 45 de ces sites ont été observés expérimentalement (Hanger et al., 2009) (figure 3). Les régions flanquantes de la protéine Tau regroupent la plupart des sites de phosphorylation, où 17 motifs thréonine-proline ou sérine-proline sont anormalement hyperphosphorylés dans la MA ainsi que dans d'autres Tauopathies. Ces motifs sont aussi les cibles de plusieurs kinases. D'autres sites de phosphorylation sont situés dans le

domaine de liaison aux microtubules. Ces sites sont phosphorylés par différentes kinases, comme les kinases régulant l'affinité aux microtubules (*microtubule affinity-regulating kinase*, MARKs), la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (*cyclic AMP-dependent protein kinase*, PKA), la protéine kinase II dépendante du calcium ou de la calmoduline (Ca^{2+} - or *calmodulin-dependent protein kinase II*, CaMKII) ou encore des tyrosines kinases (Hanger et al., 2009). Les protéines kinases mitotiques pourraient également jouer un rôle majeur dans la phosphorylation de Tau puisque plusieurs épitopes spécifiques à la mitose sont retrouvés dans les enchevêtrements neurofibrillaires, les NFTs (Kondratick and Vandre, 1996; Vincent et al., 1996). Les protéines kinases activées par le stress (*stress-activated protein kinase*, SAPK) sont aussi d'intérêt, puisque certaines SAP kinases telles que JNK/SAPK1, p38/SAPK2 et SAPK3 peuvent aussi phosphoryler la protéine Tau (Goedert et al., 1997; Jenkins et al., 2000).

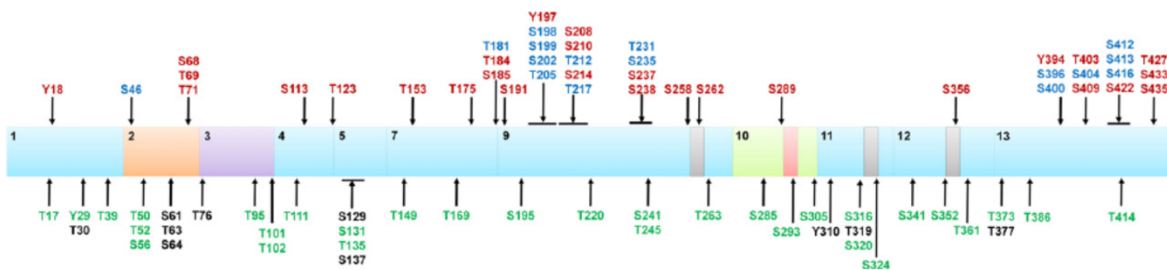


Figure 3. Sites de phosphorylation de la protéine Tau. Schéma des 85 différents sites de phosphorylation de Tau dans un cerveau normal humain (vert), dans le cerveau de patients atteints de Tauopathies (rouge), les sites phosphorylés dans les deux situations (bleu) et les sites de phosphorylation théoriques (noir). Tiré de (Martin et al., 2011).

La déphosphorylation de la protéine Tau est quant à elle due à l'action de différentes protéines phosphatases, comme la protéine phosphatase 1 (PP1), la protéine phosphatase 2A (PP2A), la protéine phosphatase 2B (PP2B), la protéine phosphatase 2C (PP2C) et la protéine phosphatase 5 (PP5) (Hanger et al., 2009). PP2A est la principale phosphatase de Tau. À elle seule, elle compte pour environ 70% de l'activité phosphatase de la Tau humaine au cerveau, cette activité étant réduite de 40% dans la matière blanche d'individus atteints de la MA (Gong et al., 1993). L'augmentation des niveaux ou de l'expression d'inhibiteurs endogènes de PP2A ou l'effet de changements post-traductionnels au niveau

de son domaine catalytique pourrait expliquer la diminution de l'activité de cette enzyme chez les patients atteints de la MA (Sontag et al., 2004; Chen et al., 2008). Les phosphatases sont sensibles aux changements de température, leur activité diminuant exponentiellement avec la température, contrairement aux kinases, où la diminution de l'activité se fait de manière linéaire (Planel et al., 2004). Par exemple, les animaux anesthésiés dans le cadre d'expérimentation subissent une hypothermie se traduisant par une forte diminution de l'activité des phosphatases de Tau et menant ainsi à son hyperphosphorylation (Planel et al., 2007).

La phosphorylation de la protéine Tau joue un rôle important dans la régulation des fonctions physiologiques de Tau, comme la liaison aux microtubules et ainsi leur stabilisation et leur assemblage. Par exemple, la phosphorylation de la Ser214 et de la Thr231 dans la région flanquante de Tau peut provoquer le détachement de la protéine Tau aux microtubules, tandis que la phosphorylation d'autres sites Ser ou Thr situés dans la région flanquante n'a que très peu d'effet sur la liaison aux microtubules. Lorsque phosphorylée, la Thr231 subit une isomérisation menant à un changement de conformation en *cis* qui diminue l'affinité de Tau avec les microtubules (Lu et al., 1999). Cette conformation *cis* a été retrouvée entre autres chez les patients atteints de la MA (Kondo et al., 2015). Ce changement peut être renversé par l'action d'une isomérase, qui permet à la protéine de revenir dans une conformation *trans* et de rétablir la liaison de Tau avec les microtubules (Lu et al., 1999). De plus, la phosphorylation particulière de la Ser262 dans le domaine de répétition de Tau par différentes kinases (MARKs, PKA ou CaMKII) peut également diminuer son affinité aux microtubules (Hanger et al., 2009).

L'hyperphosphorylation de Tau pourrait provoquer une pathologie par différents mécanismes, par exemple en altérant sa dégradation par autophagie ou par l'intermédiaire du protéasome et sa troncation par les protéases. Par exemple, la phosphorylation au niveau de la Ser422 inhibe le clivage de Tau par la caspase 3 et la phosphorylation de la Ser262 ou Ser356 empêche la reconnaissance de Tau par le complexe CHIP-HSP90, et est donc épargnée de la dégradation par le protéasome (Guillozet-Bongaarts et al., 2006; Dickey et al., 2007). Aussi, l'hyperphosphorylation de Tau pourrait provoquer la mauvaise

localisation de Tau au sein du neurone. En conditions normales, Tau est une protéine axonale, et son hyperphosphorylation pourrait causer une relocalisation au niveau somatodendritique, ce qui pourrait engendrer un dysfonctionnement synaptique par sa présence dans les terminaisons synaptiques (Hoover et al., 2010). Sa présence dans les dendrites et les épines dendritiques pourrait aussi provoquer l'inhibition du transport et la perte d'épines dendritiques (Thies and Mandelkow, 2007). De plus, l'hyperphosphorylation de Tau pourrait modifier sa liaison avec les protéines et les molécules avec lesquelles elle interagit. La protéine hyperphosphorylée peut interagir avec la protéine interagissant avec JNK (*JNK-interacting protein 1*, JIP1), une protéine associée aux kinésines, altérant la formation de complexes de kinésine et donc altérant le transport axonal (Ittner et al., 2009).

1.5.2 Autres modifications post-traductionnelles

La protéine Tau peut subir plusieurs autres changements post-traductionnels, comme l'isomérisation, la glycosylation, la glycation, la sumoylation, la troncation, la déamidation, la nitration, la méthylation, l'ubiquitination et, nouvellement identifiée, l'acétylation (Martin et al., 2011). Tau possède une activité acétyltransférase intrinsèque qui peut catalyser l'auto-acétylation à plusieurs sites lysine (Lys), comme la Lys280 (Cohen et al., 2013). L'acétylation de Tau pourrait inhiber sa dégradation (lorsqu'acétylée sur les Lys163, Lys280, Lys281 et Lys369) ou pourrait faciliter sa dégradation et supprimer sa phosphorylation ainsi que son agrégation (lorsqu'acétylée sur les sites Lys259, Lys290, Lys321 et Lys353) (Min et al., 2010; Cook et al., 2014). L'acétylation de la protéine Tau sur la Lys280 a été retrouvée dans plusieurs Tauopathies incluant la MA et est identifiée comme pathologique (Irwin et al., 2013). La *N*-glycosylation supprime la déphosphorylation de Tau et accélère sa phosphorylation, contrairement à la *O*-GlcNAcylation qui protègerait contre la phosphorylation en occupant les motifs Ser-Pro et Thr-Pro et supprimerait l'agrégation de Tau (Liu et al., 2002; Liu et al., 2004; Yuzwa et al., 2014). Dans la MA, la *O*-GlcNAcylation de Tau est diminuée, ce qui pourrait mener à l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine (Liu et al., 2004). Les autres modifications post-traductionnelles non enzymatiques comme la déamidation, l'isomérisation et la glycation ont été détectés dans les PHFs contrairement à la protéine

Tau normale, et ces modifications faciliteraient l'agrégation de Tau (Yan et al., 1995; Ledesma et al., 1995; Watanabe et al., 2004; Reyes et al., 2012).

1.6 Tauopathies

1.6.1 Étiologie

Les altérations dans la quantité ou la structure de la protéine Tau peuvent affecter son rôle comme stabilisateur des microtubules. Des changements dans l'organisation de ces microtubules peuvent quant à eux affecter la localisation ou l'organisation d'autres structures cellulaires comme les lysosomes ou les mitochondries et ainsi provoquer des effets pathologiques (Collot et al., 1984; Nangaku et al., 1994; Tanaka et al., 1998). Les modifications entraînées par la phosphorylation de Tau altèrent son interaction avec les microtubules, et donc son hyperphosphorylation est un élément essentiel des différents agrégats aberrants retrouvés dans les neurones ou parfois dans la glie de patients atteints de maladies neurologiques considérées comme des Tauopathies (Hong et al., 1998; Kadavath et al., 2015).

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par la perte de neurones et une possible présence de matériaux fibrillaires. Il existe plusieurs types d'inclusions intracellulaires comme les corps de Lewy, les corps de Hirano, les corps de Pick et les NFTs. Les protéines Tau hyperphosphorylées sont la principale composante de ces NFTs dans la maladie d'Alzheimer (Brion et al., 1985). La protéine Tau a peu tendance à s'agréger dans sa conformation native. Par contre, son agrégation en PHFs et en NFTs est connue dans plusieurs maladies neurodégénératives appelées Tauopathies. Parmi ce type de pathologies ayant en commun la présence de dépôts intracérébraux d'une forme pathologique de la protéine Tau, on retrouve plus de 20 pathologies (tableau 1), notamment la maladie d'Alzheimer (MA, ou *Alzheimer disease*, AD), la maladie de Pick, la paralysie supranucléaire progressive, la maladie d'Huntington (MH, ou *Huntington's disease*, HD), la dégénérescence corticobasale et la démence fronto-temporale avec syndrome Parkinsonien (*frontotemporal dementia with parkinsonism-17*, FTDP-17) (Lee et al., 2001).

Tableau 1. Les principales Tauopathies.

Tauopathie	Origine	Principale pathologie	Prédominance	Isoforme prédominant
Dégénérescence corticobasale	Génétique	Touffes gliales	Primaire	4R
Démence à grains argyrophiles	Non déterminé	Grains argyrophiles	Primaire	4R
Démence fronto-temporale avec parkinsonisme associée au chromosome 17	Génétique	Variée	Primaire	3R et 4R, 4R ou 3R
Démence pugilistique	Traumatique	Enchevêtrements neurofibrillaires	Secondaire	3R et 4R
Dystrophies myotoniques (types 1 et 2)	Génétique	Enchevêtrements neurofibrillaires	Secondaire	0N3R
Encéphalopathie traumatique	Traumatique	Enchevêtrements neurofibrillaires	Secondaire	3R et 4R
Maladie d'Alzheimer	Non déterminé	Enchevêtrements neurofibrillaires	Secondaire	3R et 4R
Maladie de Huntington	Génétique	Enchevêtrements neurofibrillaires et dépôts en forme de bâtonnets	Secondaire	3R et 4R ou 4R
Maladie de Niemann-Pick de type C	Génétique	Enchevêtrements neurofibrillaires	Secondaire	3R et 4R
Maladie de Pick	Génétique	Corps de Pick	Primaire	3R
Panencéphalite subaiguë sclérosante	Infectieuse	Enchevêtrements neurofibrillaires	Primaire	3R et 4R
Paralysie supranucléaire progressive	Génétique	Plaques astrocytaires	Primaire	4R
Parkinsonisme avec démence de Guadeloupe	Toxique	Plaques astrocytaires	Primaire	3R et 4R
Sclérose latérale amyotrophique/ Syndrome parkinsonien de l'île de Guam	Toxique	Enchevêtrements neurofibrillaires et astroglyopathie Tau	Primaire	3R et 4R
Syndrome de Down	Génétique	Enchevêtrements neurofibrillaires	Secondaire	3R et 4R
Syndrome parkinsonien post-encéphalique	Infectieuse	Enchevêtrements neurofibrillaires	Primaire	3R et 4R

Adapté de (Arendt et al., 2016).

Les Tauopathies peuvent être de plusieurs origines. La protéine Tau sous forme agrégée a été retrouvée notamment dans deux maladies infectieuses, soit la panencéphalite subaiguë sclérosante et le syndrome parkinsonien post-encéphalique (Hof et al., 1992; Bancher et al., 1996). Les pathologies Tau peuvent aussi être d'origine génétique, soit par des mutations directes sur le gène *MAPT* (Qian and Liu, 2014) ou par son haplotype (Caffrey and Wade-Martins, 2012). Elles peuvent être d'origine traumatique, c'est-à-dire à la suite d'un traumatisme crânien qui est présent entre autres dans plusieurs sports de contact (Ling et al., 2015), ou d'origine toxique, certaines toxines alimentaires pouvant entraîner une dégénérescence neuronale dans le syndrome parkinsonien de l'île de Guam (Spencer, 1987).

Il existe des Tauopathies primaires et secondaires. L'agrégation et l'accumulation intracellulaire de la protéine Tau apparaissent comme phénomène primaire dans les Tauopathies primaires, où les lésions de Tau sont la caractéristique principale. Les Tauopathies secondaires sont quant à elles une conséquence des changements provoqués par une autre protéine pathologique, comme l'accumulation d'A β ou de Htt (Masters et al., 2015), où l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et sa pathologie résultante apparaissent dans les stades avancés de la maladie.

1.6.2 Agrégation de la protéine Tau

Dans la plupart des maladies neurodégénératives, l'évènement pathologique le plus évident est sans doute l'agrégation des isoformes de Tau en inclusions à l'intérieur des neurones. Ces inclusions appelées PHFs possèdent des propriétés biochimiques différentes de la protéine Tau normale. Les PHFs retrouvés dans les biopsies sont plus acides et sont retrouvés sous forme de polymères insolubles agrégés, contrairement à la protéine Tau normale (Sergeant et al., 1995). Des différences peuvent être également dues à l'hyperphosphorylation de Tau, cette dernière étant associée à une dérégulation de l'activité des kinases et phosphatases (Trojanowski and Lee, 1995). Certains anticorps peuvent reconnaître des épitopes dépendants du changement de conformation dans les PHFs,

permettant ainsi une meilleure observation de leur formation induite par leur hyperphosphorylation causant l'agrégation (Jicha et al., 1997).

L'étude de la protéine Tau se fait particulièrement dans un contexte de maladie d'Alzheimer, puisque cette dernière est sans doute la Tauopathie la plus connue. Différents modèles sont fréquemment utilisés, que ce soit des modèles cellulaires, murins ou humains, afin d'étudier cette protéine dans un contexte pathologique. L'étude de la phosphorylation de la protéine Tau par immunohistochimie ou biochimie dans différents modèles de tauopathies permettrait ainsi une meilleure compréhension de la maladie d'Alzheimer.

1.7 La maladie d'Alzheimer

1.7.1 Historique

La maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite pour la toute première fois par le médecin allemand Alois Alzheimer en 1906 (Berchtold and Cotman, 1998). Dr. Alzheimer présentait le cas d'une patiente de 51 nommée Auguste Deter qui souffrait de démence. À la suite de son décès quelques années plus tard, il effectua une autopsie du cerveau de la patiente et mit en évidence deux types de lésions : les plaques amyloïdes et les dégénérescence neurofibrillaires (traduction anglaise (Alzheimer et al., 1995)). Ces deux éléments sont toujours aujourd'hui des marqueurs neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer.

Les deux types de lésions mentionnés précédemment ont été identifiés près de 80 ans plus tard. En 1984, un pathologiste américain nommé George Glenner décrivit le peptide β -amyloïde comme composante majoritaire des plaques amyloïdes extracellulaires (Glenner and Wong, 1984) tandis que Jean-Pierre Brion, en 1985, découvrit la présence de la protéine Tau phosphorylée de manière anormale dans les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires (Brion et al., 1985).

1.7.2 Description

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative progressive et irréversible menant à la démence, affectant 1 personne sur 10 âgée de 65 ans et plus, et 1 personne sur 3 âgée de 85 ans et plus (Rocca et al., 1991). Les formes sporadiques représentent la majorité des cas (plus de 90%), et l'âge avancé est le principal facteur de risque, le risque de développer la maladie doublant tous les 5 ans à partir de 65 ans. Les causes exactes des formes sporadiques ne sont pas connues et aucune mutation n'a pour l'instant été identifiée (Harvey et al., 2003). Les formes familiales sont plus agressives et sont liées à des mutations génétiques sur les présénilines 1 et 2 (*PSEN1* et *PSEN2*) ainsi que des mutations sur le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde *APP* (Rogaev et al., 1995; Harvey et al., 2003; Goate, 2006). La maladie d'Alzheimer se caractérise par une perte neuronale importante dans le cerveau, résultant en une atrophie cérébrale.

Les deux marqueurs neuropathologiques sont les plaques composées de peptides β -amyloïdes (*amyloid- β* , $A\beta$), communément appelées plaques séniles, et les enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs). Les plaques séniles sont formées par l'accumulation extracellulaire du peptide $A\beta$ en dépôts d'amyloïdes. Les plaques séniles sont distribuées de manière diffuse et aléatoire dans le cortex cérébral et dans les structures sous-corticales. L' $A\beta$ provient de son précurseur, soit la protéine précurseur de l'amyloïde- β (APP). Dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, des mutations ont été retrouvées sur le gène de l'APP, suggérant ainsi un rôle central dans la pathogénèse (Hardy and Higgins, 1992).

Les NFTs correspondent à l'agrégation de fibrilles anormales en PHFs dans certaines populations neuronales plus vulnérables (Kidd, 1963). Au niveau microscopique, les NFTs sont préférentiellement observés dans les cellules pyramidales de l'hippocampe et du cortex entorhinal, ainsi que dans les couches supragranulaires (II-III) et infragranulaires (V-VI) des régions corticales associatives (Braak and Braak, 1991; Delaere et al., 1991; Arnold et al., 1991). Le cortex moteur et le cortex primaire sensoriel sont quant à eux relativement épargnés. Certaines régions corticales et sous-corticales sont aussi affectées par la

formation de NFTs telles que l'amygdale, le raphé dorsal, le locus coeruleus et le noyau basal de Meynert (Braak and Braak, 1985). Les lésions de dégénérescences neurofibrillaires de faible densité sont aussi présentes dans le cortex entorhinal et l'hippocampe de cerveaux humains âgés non pathologiques, tandis que le néocortex montre seulement des NFTs isolés.

1.7.3 Symptômes

Tout d'abord, l'espérance de vie d'un individu atteint de la MA est en moyenne de 4 à 8 ans après le diagnostic clinique, alors que les symptômes ont déjà débuté depuis un moment (Walsh et al., 1990; Bracco et al., 1994). En général, au stade précoce de la maladie, les individus atteints de la MA montrent une altération de la mémoire épisodique causée par une atteinte pathologique de l'hippocampe. La perte de ce type de mémoire provoque des difficultés à se souvenir d'éléments récents ou de créer de nouveaux souvenirs. Les individus atteints de la MA au stade précoce sont lucides et conscients des changements, mais leur humeur, leur concentration et leur sens de l'orientation peuvent être affectés (Jost and Grossberg, 1995).

Au stade modéré, il y a développement de l'amnésie et donc de la détérioration de la mémoire. Le patient atteint de la MA ne reconnaît plus son entourage ni son environnement. Les symptômes de ce stade incluent aussi l'aphasie, l'apraxie et l'agnosie, qui sont respectivement des troubles du langage, du mouvement et de l'identification. Des troubles de la mémoire déclarative est prédominante (Forstl and Kurz, 1999). Des changements d'humeur beaucoup plus importants se produisent, incluant la dépression ou de l'agressivité.

Au stade avancé, les symptômes s'aggravent et mènent à une importante apathie et une perte de locomotion. L'individu malade a de la difficulté à se faire comprendre et à se souvenir, et, lorsque les symptômes sont à leur paroxysme, des infections peuvent survenir et causer la mort du patient (Forstl and Kurz, 1999).

1.7.4 Diagnostic

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer se fait surtout par des critères cliniques et peut être soutenu par la présence de quelques biomarqueurs. Selon les critères définis en 1984 par le «*National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*» (NINCDS-ADRDA), il est possible pour le neurologue de diagnostiquer une MA certaine, probable ou possible (McKhann et al., 1984). Toujours selon le critère NINCDS-ADRDA, pour établir un diagnostic de maladie d'Alzheimer bien défini, il est nécessaire de démontrer la présence de plaques amyloïdes et de NFTs dans des régions spécifiques du cortex cérébral (McKhann et al., 1984; Hyman and Trojanowski, 1997). Il existe aussi d'autres types de classification, comme les tests neuropsychologiques du *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD) (Rossetti et al., 2010).

Plusieurs changements au niveau des critères cliniques de diagnostic ont été effectués depuis 1984. Une terminologie pour classer les individus souffrant de démence causée par la MA a été proposée et il est possible ainsi de distinguer une démence MA possible, une démence MA probable ou une démence possible ou probable avec preuves du processus physiopathologique de MA grâce à des critères modifiés et améliorés depuis 2011 (McKhann et al., 2011).

Les critères cliniques de base pour la démence MA possible peuvent dépendre des circonstances entourant le diagnostic, comme le cours atypique de la démence, où des déficits cognitifs de la démence de type MA sont présents, mais leur début est soudain et l'historique détaillé du déclin cognitif est insuffisant (McKhann et al., 2011). Sinon, une étiologie mixte présente tous les critères de base de diagnostic de démence MA, mais possède des preuves de maladie vasculaire cérébrale concomitante, des caractéristiques de démence à corps de Lewy ou des preuves de maladie neurologique, de comorbidité médicale non neurologique ou d'utilisation de médication pouvant avoir un impact sur la cognition.

Une démence MA probable est diagnostiquée lorsque le patient rencontre les critères de démence et possède un début graduel des symptômes, un historique précis de détérioration de la cognition et lorsque les déficits cognitifs sont évidents dans l'historique ou l'examen lors de présentations amnésiques ou non amnésiques. Le diagnostic de démence MA probable ne devrait pas s'appliquer lorsqu'il y a des preuves d'éléments servant au diagnostic de démence MA possible, comme la présence de maladie vasculaire cérébrale, de caractéristiques de démence à corps de Lewy, etc. Chez les patients présentant les critères cliniques de base pour la démence MA probable, un déclin cognitif documenté augmente la certitude que la condition représente un processus pathologique qui évolue, mais n'augmente pas spécifiquement la certitude qu'il s'agit d'un processus physiopathologique de MA. Aussi, la présence de mutations génétiques sur *APP*, *PSENI* et *PSEN2* augmente aussi la certitude que la condition est causée par la MA. (McKhann et al., 2011).

Chez les patients possédant les critères cliniques de base de démence MA probable, la présence de biomarqueurs peut augmenter la certitude que les bases du syndrome de démence clinique provient du processus physiopathologique de la MA. Les biomarqueurs majeurs de la MA sont divisés en deux classes, soit les biomarqueurs de la déposition cérébrale de protéine A β et les biomarqueurs en aval de la dégénérescence neuronale ou de blessure. La première catégorie comporte des niveaux faibles de A β 42 et une imagerie par tomographie par émission de positron (*positron emission tomography*, PET) amyloïde positive (Jack et al., 2008; Chetelat et al., 2010). Les trois biomarqueurs majeurs de la deuxième catégorie sont la protéine Tau (autant la forme totale que phosphorylée) dans le liquide céphalo-rachidien à un niveau élevé, une absorption de fluorodéoxyglucose diminuée par PET dans le cortex temporal et pariétal ainsi qu'une atrophie disproportionnée par imagerie par résonance magnétique (McKhann et al., 2011). Les résultats des tests des différents biomarqueurs peuvent se regrouper en trois catégories : positif, négatif ou indéterminé. La catégorie de démence MA possible avec preuves de processus physiopathologique de la MA s'adresse aux patients possédant les critères cliniques de démence non reliée à la MA mais possédant les biomarqueurs physiopathologiques ou les critères neuropathologiques de la MA.

Pour procéder au diagnostic, le clinicien doit d'abord procéder à une vérification d'antécédents de démence dans la famille du patient, d'accidents vasculaires cérébraux, de traumatisme crâniens, de commotions cérébrales et la présence de certaines pathologies comme l'obésité ou le diabète, qui pourrait augmenter le risque de développer la maladie d'Alzheimer (Brands et al., 2005; Gaudieri et al., 2008; Gratuze et al., 2017). Une rencontre des proches du patient est nécessaire pour le diagnostic puisque certains changements peuvent être observés par ceux-ci sans que le patient ne s'en rende compte. S'ensuit une évaluation cognitive par le clinicien, où le patient doit répondre au MMSE (*Mini-Mental State Examination*), un test de 18 questions ou tâches à accomplir en 15 minutes (Folstein et al., 1975). Ce test permet d'évaluer la mémoire, l'apprentissage, l'attention, le langage et l'orientation en fournissant une note située entre 0 et 30 points (Arevalo-Rodriguez et al., 2015).

À la suite du test MMSE, une note obtenue de 28 points ou plus est normale. Une note entre 18 et 26 points montre une légère démence tandis qu'une note située entre 10 et 18 points indique une démence modérée. Finalement, une note inférieure à 10 points démontre une démence sévère. Cependant, le niveau d'éducation du patient doit être pris en compte lors de ce test.

1.7.5 L'amyloïde- β

L'agrégation du peptide amyloïde- β contribue à la formation de plaques amyloïdes extracellulaires. Ce peptide provient du clivage de l'APP, une protéine transmembranaire dont les fonctions sont encore mal connues. L'APP est clivé par deux sécrétases menant à deux types de voies : la voie amyloïdogénique et la voie non amyloïdogénique. La voie non amyloïdogénique provient du clivage de l'APP par la α -sécrétase, formant un peptide soluble sAPP α qui est neuroprotecteur et une fraction C83 (Zhou et al., 2011; Chasseigneaux and Allinquant, 2012). C83 sera clivé à son tour par une γ -sécrétase, qui formera deux fragments, l'un extracellulaire (P3) et un intracellulaire (AICD50). La voie amyloïdogénique, quant à elle, est issue du clivage de l'APP par la β -sécrétase, une

protéase transmembranaire formant un peptide soluble sAPP β et une fraction C99 (Hussain et al., 1999; Vassar, 2014). La fraction C99 sera clivée ensuite par une γ -sécrétase, produisant un fragment intracellulaire AICD50 et le peptide A β . Deux formes de peptides peuvent être produites par ce clivage : A β 40 et A β 42. Le peptide A β 42 possède des propriétés d'agrégation et engendre ainsi la formation de plaques amyloïdes extracellulaires. Le peptide A β 40 s'accumule quant à lui dans le système vasculaire et conduit à une autre pathologie, l'angiopathie amyloïde cérébrale (Suzuki et al., 1994). Dans la maladie d'Alzheimer, les monomères d'A β solubles formeront des oligomères, ensuite des protofibrilles avec une plus faible solubilité puis en fibrilles, pour finalement s'agréger en plaques amyloïdes (Selkoe, 2000; Kaye et al., 2009; Viola and Klein, 2015).

1.7.6 La protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer

Les NFTs présents dans le cerveau de patients atteint de la MA sont composés de PHFs contenant la protéine Tau hyperphosphorylée, et le nombre de NFTs corrèle avec le degré de démence dans la MA (Grundke-Iqbal et al., 1986a; Ihara et al., 1986; Arriagada et al., 1992). La formation des PHFs à partir de Tau pourrait suivre une voie impliquant la phosphorylation, un changement de conformation de la protéine et finalement la polymérisation. De plus, les cerveaux atteints de la MA contiennent une quantité plus grande de Tau en comparaison aux cerveaux contrôles qui ne sont pas affectés par la maladie (Khatoon et al., 1992; Khatoon et al., 1994).

Les composantes antigéniques majeures des PHFs sont les protéines Tau et la phosphorylation a été montrée comme étant la majeure modification de ces protéines (Brion et al., 1985; Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986a; Goedert et al., 1989). Les agrégats de Tau dans la MA sont composés des six isoformes de Tau présents dans le système nerveux central dans leur forme phosphorylée. La caractérisation biochimique de la protéine Tau par immunobuvardage indique que la combinaison des isoformes de Tau hyperphosphorylés résulte en la présence d'un triplet de protéines, aussi appelé PHF-Tau, à des poids moléculaires de 55, 64 et 69 kDa (Delacourte et al., 1990; Lee

et al., 1991; Goedert et al., 1994). Une autre bande d'une hauteur d'environ 74 kDa est aussi présente plus faiblement et correspond à l'isoforme le plus long (Brion et al., 1991b; Goedert et al., 1992; Sergeant et al., 1997). La grandeur de l'isoforme ainsi que sa phosphorylation seraient responsables des variations de leur mobilité électrophorétique (Brion et al., 1991a; Sergeant et al., 1995; Mailliot et al., 1998).

En utilisant des anticorps dirigés contre les sites de phosphorylation de Tau, il est possible d'étudier des échantillons de cerveaux post-mortem. Une corrélation entre la présence du triplet de protéines Tau et la détection immunohistochimique des NFTs a été démontrée, permettant d'utiliser le profil électrophorétique du triplet de Tau comme marqueur du processus de dégénérescence et ainsi d'utiliser les protéines Tau pour quantifier la dégénérescence neurofibrillaire (Flament et al., 1990). Pendant les stades précoces de la MA avec un déclin modéré des fonctions cognitives, la propagation de la dégénérescence neurofibrillaire est hautement spécifique. Elle se fait à partir de la formation hippocampique jusqu'au cortex temporal antérieur, inférieur et moyen. La maladie progresse alors dans les aires associatives du cortex frontal, du cortex pariétal et du cortex temporal. En dernier lieu, la dégénérescence touche les aires sensorielles et motrices primaires comme le cortex visuel primaire ou le cortex moteur primaire (Delacourte et al., 1998; Delacourte et al., 1999).

1.8 La maladie de Huntington

1.8.1 Description

La maladie de Huntington (MH), ou en anglais *Huntington's disease* (HD), est une maladie neurodégénérative autosomique dominante qui se manifeste généralement en milieu de vie, généralement entre 35 et 50 ans. Cette maladie est causée par une expansion aberrante de répétitions de cytosine-adénine-guanine (CAG), codant pour l'acide aminé glutamine, dans le gène de la protéine huntingtine (Htt) sur le chromosome 4 (Ross and Tabrizi, 2011). Cette mutation entraîne une dégénérescence progressive du cerveau et mène ultimement à la mort. La MH progresse lentement et comporte deux stades majeurs. D'abord, le stade

pré-MH, où les individus atteints de la maladie ont été diagnostiqués par un test génétique positif pour la présence de répétition anormale de CAG, mais ne présentent pas encore de symptômes moteurs. S'ensuit alors le stade symptomatique de la MH, où les patients présentent des symptômes moteurs qui valident le diagnostic posé par le médecin (Bates et al., 2015).

1.8.2 Symptômes

Les symptômes de la maladie de Huntington sont caractérisés par des déficits moteurs, cognitifs et psychiatriques. Au début de la MH, les patients souffrent de symptômes plutôt psychologiques, tels l'agitation, l'irritabilité, l'apathie, l'anxiété, la désinhibition, des hallucinations et la dépression (Warby et al., 1993). Des déficits cognitifs apparaissent aussi tôt, mais peu de symptômes moteurs surviennent ou sont de faible amplitude et presque imperceptibles (Ready et al., 2008). Dans les stades un peu plus avancés, là où le diagnostic est posé, les symptômes cliniques incluent une dystonie, des mouvements involontaires de type chorée (des mouvements imprévisibles, irréguliers et spontanés), des troubles de l'équilibre et du langage, un temps de réaction lent, une perte de poids et une faiblesse généralisée. Aux stades tardifs de la maladie, il y a exacerbation des symptômes et présence d'une chorée sévère, de bradykinésie, de démence, de troubles de la mémoire, de rigidité, d'un trouble de la déglutition, d'une sévère perte de poids, d'une incapacité à parler ou à marcher ainsi qu'une perte d'autonomie marquée (Warby et al., 1993).

Au niveau neuropathologique, une dégénérescence sélective des neurones situés dans noyau caudé et dans le putamen est particulièrement présente (Cowan and Raymond, 2006). Les symptômes de chorée sont attribuables à la dégénérescence préférentielle des neurones contenant les enképhalines de la voie de signalisation indirecte du contrôle du mouvement au niveau des ganglions de la base (Mitchell et al., 1999). D'autres régions impliquées dans la cognition comme l'hippocampe et le cortex frontal sont touchées dans la progression de la maladie (Zheng and Diamond, 2012). Plusieurs régions du cortex, la substance noire et les tissus périphériques peuvent aussi être affectées, tandis que les interneurons du striatum sont généralement épargnés (Vonsattel et al., 1985; van der Burg et al., 2009;

Dominguez et al., 2013). Des inclusions neuronales formées de protéines Htt agrégées sont des marqueurs neuropathologiques de la MH. Différents grades de la maladie, appelés grades de Vonsattel, ont été attribués selon les caractéristiques observées au niveau microscopique et macroscopique dans diverses régions du cerveau touchées par la MH (Vonsattel et al., 1985) (tableau 2).

Tableau 2. Grades de Vonsattel dans la maladie de Huntington

Grade	Observation	Caractéristiques
Grade 0	Macroscopique	Aucune anormalité
	Microscopique	Aucune anormalité
Grade 1 (HD1)	Macroscopique	Aucune anormalité
	Microscopique	Noyau caudé : gliose modérée Putamen : gliose légère
Grade 2 (HD2)	Macroscopique	Noyau caudé : atrophie (médialement convexe) Putamen : légère atrophie Pallidus : normal
	Microscopique	Noyau caudé : gliose modérée and perte neuronale médiale Putamen : gliose légère and perte neuronale dorsale
Grade 3 (HD3)	Macroscopique	Noyau caudé : atrophie (perte de convexité médiale) Putamen et pallidus : atrophie modérée
	Microscopique	Noyau caudé : gliose et perte neuronale, sévère médialement et modérée latéralement Putamen : gliose et perte neuronale, sévère médialement et modérée latéralement
Grade 4 (HD4)	Macroscopique	Noyau caudé, putamen et pallidus : atrophie sévère (concave médialement)
	Microscopique	Noyau caudé et putamen : gliose très sévère et perte neuronale globale Accumbens : gliose modérée

Adapté de (Xuereb et al., 1996).

1.8.3 Diagnostic

Le diagnostic de la maladie de Huntington repose sur la présence de symptômes comme un handicap progressif moteur de type chorée, un déclin cognitif, un changement au niveau de la personnalité et un historique familial en lien avec une maladie autosomique dominante (Warby et al., 1993). Le diagnostic se confirme par un test génétique moléculaire pour déterminer le nombre de répétitions de glutamine (CAG) situés dans l'exon 1 du gène codant pour la protéine Htt (Craufurd et al., 2015). L'âge du début de la maladie et le diagnostic de sévérité est déterminé cliniquement par l'apparition des symptômes moteurs.

Puisque la MH est une maladie autosomique dominante, la présence d'un seul allèle muté peut engendrer la maladie. Les allèles normaux possèdent un nombre inférieur à 26 répétitions CAG, tandis les allèles définis comme intermédiaires ont entre 26 et 35 répétitions CAG. Les allèles de cette dernière catégorie ont aussi été décrits comme des allèles normaux mutables. Un individu possédant un allèle intermédiaire ne risque pas de développer les symptômes de la maladie, mais il est à risque d'avoir un enfant ayant un allèle causant la MH à cause de l'instabilité de la séquence CAG (Semaka et al., 2006). Les allèles causant la MH possèdent 36 répétitions CAG ou plus et les individus porteurs de ces allèles sont à risque de développer la maladie. Un patient ayant de 36 à 39 répétitions CAG sur un allèle est à risque de développer la MH, mais pourrait ne jamais développer de symptômes. Ces allèles sont donc à pénétrance réduite. Les allèles à pénétrance complète, quant à eux, possèdent au moins 40 répétitions et sont associés avec le développement de la maladie (Warby et al., 1993).

1.8.4 La protéine huntingtine

La maladie de Huntington est causée par une séquence anormale de plus de 39 répétitions CAG (poly-glutamine, ou poly-Q) dans l'exon 1 du gène humain codant pour la protéine huntingtine (Htt) (Gusella et al., 1983). Cette expansion de nombre de répétitions provoque la formation d'une protéine Htt mutante formant des oligomères et des intermédiaires globulaires, qui à leur tour forment des agrégats. Ces derniers sont associés à une

dysfonction neuronale et à la neurodégénérescence, surtout au niveau du striatum et du cortex. Au niveau cellulaire, la protéine Htt mutante (mHtt) subit un clivage protéolytique, un mauvais repliement et une agrégation dans tous les types cellulaires, causant des déficits dans le transport axonal, la transcription et les fonctions mitochondriales, menant à la mort neuronale (Cisbani and Cicchetti, 2012). La protéine Htt jouerait un rôle dans le transport vésiculaire et la sécrétion de facteurs neurotrophiques. Une corrélation a été établie entre le nombre de répétition CAG et l'âge auquel les symptômes moteurs apparaissent (Zuccato et al., 2010). Cependant, l'âge d'apparition de la maladie, sa manifestation et sa progression varie grandement entre les patients même s'ils possèdent des longueurs de répétition CAG semblables (Ranen et al., 1995).

1.8.5 La protéine Tau dans la maladie de Huntington

Plusieurs cas ont démontré la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires dans le cerveau de patients âgés atteints de la maladie de Huntington (Myers et al., 1985; Moss et al., 1988) et la présence d'une pathologie Tau dans 60% des cas de MH (Jellinger, 1998). Une autre étude a aussi montré la colocalisation des protéines Htt et Tau, en plus de la présence de NFTs chez une patiente de 70 ans atteinte de la MH (Caparros-Lefebvre et al., 2009). Plus récemment, dans une cohorte de 35 patients atteints de la MH et de 35 individus contrôles de mêmes âges, une augmentation du niveau total de protéine Tau dans le liquide céphalo-rachidien a été détectée chez les patients avec la MH contrairement aux contrôles (Constantinescu et al., 2011). Une association linéaire positive a été décrite entre les concentrations de Htt et de Tau dans le liquide céphalo-rachidien dans deux cohortes totalisant 39 patients atteints de la MH (Wild et al., 2015). Récemment, des dépôts de protéines Tau nucléaires en forme de bâtonnets ont été retrouvés dans des échantillons de cerveaux post-mortem atteints de la MH (Fernandez-Nogales et al., 2014).

Dans des modèles murins de la MH, une augmentation du ratio des isoformes 4R/3R et une diminution du phénotype moteur dans les modèles de souris transgéniques Htt mutante avec une réduction génétique de Tau ont été observées (Fernandez-Nogales et al., 2014). Toujours dans les modèles de souris transgéniques de la maladie de Huntington, la mHtt

altère la phosphorylation de Tau, connue comme caractéristique des PHFs insolubles formant les NFTs (Blum et al., 2015; Gratuze et al., 2015). Toutes ces études au niveau de modèles cellulaires, animaux et de cerveaux post-mortem tendent à démontrer que la pathologie de la maladie de Huntington serait accompagnée d'anormalités dans l'expression de Tau et ses modifications post-traductionnelles.

Pour étudier les différentes Tauopathies, différents modèles sont utilisés, que ce soit au niveau cellulaire murin ou humain. Pour étudier les protéines dans un contexte pathologique, la fixation des tissus étudiés est nécessaire pour éviter la dégradation des cellules et ainsi pouvoir analyser les protéines d'intérêt comme la protéine Tau. Différentes méthodes de fixation des tissus pour l'étude des protéines seront présentées dans la partie suivante.

2. Les méthodes de fixation

2.1 Fonctions

L'étude des processus et mécanismes intracellulaires est importante pour la compréhension de la fonction de certaines composantes cellulaires. Ces fonctions sont particulièrement étudiées dans un contexte de pathologie; cependant, peu de techniques permettent l'obtention d'informations concernant la composition ou la distribution de molécules biologiques sur des tissus ou des cellules vivantes (Hobro and Smith, 2017). La fixation de tissus ou de cellules à l'aide d'un fixateur est l'une des méthodes utilisées pour l'observation d'un état cellulaire ou de la présence d'une molécule particulière à l'intérieur d'un tissu ou de cellules.

La fixation d'un tissu peut être utilisée pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les étapes de préparation requises préalablement à une technique particulière peuvent être brusques ou impossible à effectuer sur des cellules vivantes. Par exemple, la microscopie électronique peut nécessiter une déshydratation, un marquage, l'enrobage en résine et le sectionnement de cellules avant la prise de mesure. De plus, il peut y avoir un intervalle de temps

considérable entre la collecte de l'échantillon et son analyse, ce phénomène étant plus commun en clinique, où des frottis de cellules peuvent être recueillis lors d'une visite médicale ou une intervention chirurgicale et envoyés à différents endroits pour être analysés par un pathologiste dans les jours ou semaines qui suivent. L'approvisionnement d'échantillons de cellules dans les banques de tissus demande alors une fixation efficace des échantillons puisque le délai entre la collecte d'échantillons et l'analyse de ceux-ci peut prendre plusieurs mois, voire années.

Aussi, une technique peut demander le retrait de certaines composantes cellulaires avant l'analyse. Par exemple, l'immunohistochimie ou l'immunofluorescence utilisant des anticorps primaires et secondaires nécessitent que la membrane plasmique des cellules soit brisée. Ces méthodes exigent une fixation et une perméabilisation de la membrane cellulaire, c'est-à-dire la création de trous pour permettre l'accès aux anticorps à l'intérieur des cellules, où ils iront rejoindre leur cible. Un échantillon peut également être utilisé pour éventuellement plus d'une technique. Une fixation est nécessaire pour s'assurer qu'il n'y ait pas de variation ou de dégradation entre les différentes mesures et analyses, à moins que les mesures puissent être prises simultanément.

Les processus de fixation sont souvent utilisés pour investiguer une composante cellulaire au sein de tissus par immunomarquage, c'est-à-dire par immunohistochimie ou par immunofluorescence. La cause la plus connue d'un faible marquage immunologique dans les tissus enrobés dans la paraffine n'est pas la technique utilisée en soi, mais bien l'altération des sites antigéniques par le processus initial de préparation des tissus. Ce processus inclut la fixation des tissus, le traitement de ceux-ci et la préparation des coupes de tissus. La fixation des tissus a un impact sur le marquage immunologique obtenu puisque la plupart des antigènes sont altérés pendant le processus (Hobro and Smith, 2017).

2.2 Types de fixation

2.2.1 Fixation physique

La fixation de tissus peut se faire grâce à des méthodes de fixation physique. Parmi ces méthodes, on retrouve notamment la fixation par la chaleur, par les micro-ondes et par cryopréservation (*freeze-drying*). La fixation par la chaleur est rarement utilisée sur des tissus biologiques, cette technique étant plutôt réservée à l'étude des micro-organismes en microbiologie. La fixation par micro-ondes, qui peut être considérée comme une sorte de fixation par la chaleur, est de plus en plus utilisée dans les laboratoires vu sa rapidité et sa simplicité. La cryopréservation, quant à elle, est particulièrement utilisée en histologie et en histochimie, mais est rarement utilisée pour le diagnostic d'échantillons de tissus telles les biopsies (Eltoum et al., 2001).

2.2.2 Fixation chimique

Les méthodes de fixation peuvent être classées en quatre principaux groupes selon leur nature chimique : les aldéhydes, les alcools, les agents oxydants et les fixateurs métalliques (Thavarajah et al., 2012). Elles peuvent être également classées selon leur action : par réticulation ainsi que liaisons intramoléculaires et intermoléculaires (*cross-linking*), par déshydratation, par les effets de la chaleur ou par les effets de l'acide (Srinivasan et al., 2002). Plusieurs chercheurs qui ont évalué les méthodes de fixation selon les cellules ou tissus particuliers utilisés ont noté que le choix du fixateur était souvent un choix personnel ou en fonction de la commodité pour une méthode précise, et non un choix en fonction des caractéristiques de préservation du fixateur (Hobro and Smith, 2017). Certains fixateurs sont plus efficaces pour préserver certains constituants cellulaires que d'autres, et c'est pourquoi il est important de bien choisir la méthode de fixation à utiliser.

Les tissus peuvent être fixés de deux façons : par immersion ou par perfusion. La fixation par immersion est convenable pour de petits échantillons de tissus plutôt minces. Dans cette méthode, le tissu est simplement trempé dans une solution de fixation, appelée fixateur.

Elle est particulièrement utilisée pour fixer des sections congelées déjà montées sur lames. Ces dernières sont alors trempées dans le fixateur, souvent le méthanol ou la formaline, pendant quelques minutes. La fixation par immersion est déconseillée pour les tissus plus grands ou pour des organes complets puisque le fixateur fixe l'extérieur du tissu et nuit à la pénétration au centre du tissu, ce qui peut résulter en une dégradation à l'intérieur de l'organe.

La fixation par perfusion consiste à effectuer une perfusion intracardiaque dans le modèle animal étudié. Ce type de fixation se pratique uniquement sur des tissus murins et non sur des biopsies. D'abord, l'animal est anesthésié et couché sur le dos. Une incision est faite juste sous le sternum et une autre incision est alors faite du diaphragme jusqu'au processus xiphoïde. Le diaphragme est ensuite retiré à l'aide de ciseaux chirurgicaux et la plèvre est percée pour avoir accès au cœur de l'animal. Le péricarde est retiré et, à l'aide d'une aiguille, un trou est percé dans l'atrium droit pour drainer les liquides. Pendant ce temps, un trou est percé dans le ventricule gauche et une solution saline est injectée dans le système vasculaire. Le sang est alors éliminé de la circulation sanguine, cette dernière étant utilisée ensuite pour acheminer le fixateur de manière uniforme dans tout le corps incluant le cerveau. Une fois le fixateur injecté, les organes ou tissus d'intérêt peuvent finalement être prélevés. Par contre, des analyses biochimiques et immunohistochimiques peuvent être prévues pour le cerveau et sa fixation complète nuirait aux analyses biochimiques suivantes. Ainsi, le sang peut être éliminé de la circulation sanguine par l'injection d'une solution saline, puis l'organe peut être récupéré et séparé, soit une partie dans le fixateur pour les analyses immunohistochimiques et l'autre congelée pour les analyses biochimiques.

2.3 Mécanismes moléculaires

2.3.1 Cross-linking

Les solutions de fixation additives (aussi appelées fixation par *cross-linking*) contiennent plusieurs aldéhydes et peuvent créer des liaisons covalentes entre les protéines (Dapson,

2007). Le *cross-link* permet la formation de liaisons intramoléculaires et intermoléculaires. Les fixateurs causant ce type de fixation réagissent avec la plupart des groupes terminaux des molécules biologiques (comme les amines, les amides, les hydroxyles, les sulfhydryles, etc.) pour faire des produits d'addition qui sont réactifs et peuvent lier d'autres groupes terminaux à proximité. Le *cross-linking* se produit lentement par la suite, lorsque les adduits hydroxyméthyles sont en place. Ces adduits sont attachés à des atomes d'azote, d'oxygène, de soufre et de carbone. Les liaisons intermoléculaires impliquent les mêmes types de groupes terminaux pour former des ponts méthylènes (-CH₂-). Le *cross-linking* est une réaction réversible par les lavages prolongés ou par les méthodes de récupération des épitopes induite par la chaleur (*heat-induced antigen retrieval*, HIER) (Dapson, 2007). Cette réaction par les fixateurs par addition permet également de préserver la structure naturelle des protéines, c'est-à-dire leurs structures secondaires et tertiaires (Meade et al., 2010). Une fois fixées et stabilisées par les adduits et les liaisons intermoléculaires, les macromolécules sont suffisamment rigides pour ne pas être réarrangées par des forces physiques ou chimiques pendant les expériences de marquages immunologiques.

2.3.2 Dénaturation

Les méthodes de dénaturation peuvent dénaturer les protéines en réduisant leur solubilité ou en déstabilisant leurs liaisons hydrogènes, ce qui inactive les enzymes et modifie la structure tertiaire des protéines (St-Laurent et al., 2006). L'effet de dénaturation est le plus souvent induit par la déshydratation. Les fixateurs à base d'alcool peuvent provoquer une déshydratation moléculaire (Namimatsu et al., 2005). L'éthanol, par exemple, peut catalyser certaines réactions en agissant sur les adduits hydroxyméthyles qui n'ont pas préalablement fait de *cross-link*. Il catalyse la formation d'imines hautement réactives en retirant l'atome d'hydrogène de l'azote de l'amine du groupement terminal original et du groupe hydroxyle de l'adduit formé par le formaldéhyde, par exemple (Dapson, 2007). Cette imine réagit ensuite avec une autre molécule d'éthanol pour former différents produits. Les imines peuvent également faire des liaisons intermoléculaires avec des groupes terminaux voisins à une vitesse plus élevée que les adduits hydroxyméthyles (Rait et al., 2006).

Les alcools ou l'acétone remplace l'eau libre dans les cellules et les tissus et provoque un changement dans la structure tertiaire des protéines en déstabilisant les liaisons hydrophobes. Les régions hydrophobes, retrouvées majoritairement à l'intérieur de la molécule, sont relâchées par la répulsion de l'eau et deviennent libres d'occuper un plus grand espace. Les régions hydrophiles des protéines possèdent des molécules d'eau qui sont liées par des liaisons hydrogènes faibles, donc le retrait de ces molécules déstabilise aussi ces liaisons. Les changements produits dans la conformation des molécules des protéines provoquent un changement de leur solubilité. Les protéines solubles dans l'eau deviennent ainsi insolubles et ce changement est irréversible même si la protéine est retournée dans un environnement aqueux (Eltoum et al., 2001).

2.4 Fixateurs utilisés en laboratoire

2.2.1 Les aldéhydes

Les fixateurs à base d'aldéhyde servent d'agents pour le *cross-link* qui réagissent avec les protéines et les acides nucléiques dans la cellule (Srinivasan et al., 2002; Troiano et al., 2009). Ces fixateurs incluent notamment le formaldéhyde (aussi appelé formaline dans son état liquide (Kiernan, 2003)), le paraformaldéhyde et le glutaraldéhyde. Le formaldéhyde, en particulier, est un fixateur largement utilisé qui produit un faible rétrécissement et une bonne préservation de la structure cellulaire pour plusieurs types de cellules et de tissus (Thavarajah et al., 2012), et ne semble pas provoquer de changements structuraux significatifs aux protéines (Mason and O'Leary, 1991). Par contre, le formaldéhyde peut provoquer un effet de renflement ou de protrusion au niveau de la membrane plasmique ainsi que la formation d'indentations ou de vacuoles près des membranes nucléaires ou mitochondriales (Fox et al., 1985). Tous les aldéhydes agissent via le *cross-link* des protéines, mais la nature des différents fixateurs peut influencer l'efficacité de la fixation. Par exemple, le glutaraldéhyde possède une meilleure efficacité pour préserver l'ADN de haut poids moléculaire que le formaldéhyde, mais il possède une faible immunoréactivité lors de marquage immunologique (Suthipintawong et al., 1996; Srinivasan et al., 2002).

2.2.2 Les solvants organiques

Les solvants organiques préservent les cellules par un processus de déshydratation et de précipitation des protéines (Vielkind and Swierenga, 1989; Troiano et al., 2009). Parmi ces solvants, on retrouve entre autres le méthanol, l'éthanol et l'acétone, et ces types de fixateurs ont démontré une meilleure efficacité à préserver le contenu en acides nucléiques à l'intérieur des cellules que les fixateurs à base d'aldéhydes (Noguchi et al., 1997; Srinivasan et al., 2002; Gillespie et al., 2002). Le méthanol est particulièrement utilisé pour les immunomarquages puisqu'il fournit des bons niveaux de marquage avec un faible niveau de marquage de fond (*background*) ou non-spécifique (Levitt and King, 1987). L'acétone, de son côté, provoque la dissolution de membranes lipidiques et la coagulation des protéines (van der Loos, 2007). Cependant, les solvants organiques provoquent des dommages au niveau des éléments de structure, tels que les microtubules, ainsi que la perte de structure des membranes cellulaires, la perte d'organelles cytoplasmiques et la perte de contenu nucléaire (Vielkind and Swierenga, 1989; Hoetelmans et al., 2001). Des mélanges de fixateurs sont également utilisés pour tenter de compenser les faiblesses de chacun. On retrouve notamment le fixateur de Carnoy (composé d'éthanol, de chloroforme et d'acide acétique glacial) et le Methacarn (composé de méthanol, de chloroforme et d'acide acétique glacial).

2.3.3 Autres fixateurs

L'utilisation de certains fixateurs additionnels a été validée pour les études par immunohistochimie, mais ils sont controversés pour leur utilisation en tant qu'agent de préservation des acides nucléiques (Urieli-Shoval et al., 1992). Les fixateurs contenant de l'acide picrique (comme la solution de Bouin), du chlorure mercurique (comme les solutions de B5, de Zenker, de Helly et de Ridley) ou de l'acide tannique sont utilisés pour augmenter la pénétration dans les tissus, tandis que ceux contenant des solutions de phénol ou de métaux lourds comme le sulfate de zinc sont utilisés pour améliorer la précipitation des protéines (Srinivasan et al., 2002).

Hypothèses et objectifs

1. Hypothèses

Pour étudier la protéine Tau, certains laboratoires utilisent des modèles cellulaires, mais aussi des modèles animaux, principalement la souris. Des méthodes de préparation et de fixation diverses sont utilisées pour les expériences *in vivo* afin de caractériser la protéine dans différents contextes pathologiques. Certains laboratoires exécutent une perfusion intracardiaque pour le sacrifice de l'animal, tandis que d'autres préfèrent la dislocation cervicale ou la décapitation. Plusieurs d'entre eux utilisent le paraformaldéhyde (PFA) 4% pour la fixation des tissus biologiques prélevés, particulièrement le cerveau pour l'étude de la protéine Tau, tandis que d'autres utilisent la solution de Bouin ou le glutaraldéhyde. Certains préfèrent utiliser le fixateur à 4°C, tandis que d'autres le laissent à température pièce. L'utilisation de différentes conditions de préparation et de fixation pourrait potentiellement avoir un effet sur l'observation de la protéine Tau et ainsi affecter les résultats obtenus, menant ultimement à des conclusions différentes pour une même pathologie. Plusieurs études ont comparé les différences d'efficacité des fixateurs utilisés, mais aucune n'a montré quelle était la meilleure combinaison de méthodes pour l'étude de la protéine Tau en particulier.

Des millions de personnes à travers le monde sont atteintes de démences, et les Tauopathies font partie de ce nombre. Depuis la découverte de son rôle dans la pathogénèse de plusieurs Tauopathies, notamment la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau est au sein de divers travaux de recherche portant sur les maladies neurodégénératives et autres pathologies comme le diabète ou l'obésité. Cette protéine subit différentes modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation qui joue un grand rôle dans la régulation physiologique de la protéine Tau. La phosphorylation est également impliquée lors d'autres changements post-traductionnels, accentuant ainsi son rôle dans la pathogénèse des Tauopathies.

La maladie d'Alzheimer est la plus connue des Tauopathies, mais il existe des Tauopathies dites secondaires, où l'hyperphosphorylation, l'agrégation ou les défauts d'épissage alternatif de la protéine Tau et sa pathologie résultante apparaissent plutôt dans les stades avancés de la maladie. Parmi les Tauopathies secondaires, on retrouve notamment la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington. Plusieurs études ont démontré la présence d'une pathologie Tau dans des modèles cellulaires et animaux de la MH. Certains patients âgés atteints de cette maladie ont été diagnostiqués avec des enchevêtrements neurofibrillaires et des anomalies au niveau de la phosphorylation et de l'épissage alternatif de la protéine Tau. La pathologie Tau chez l'humain a été caractérisée dans des cohortes de moins de 50 patients seulement, mais pas dans une plus grande cohorte avec plusieurs grades pour compenser la variabilité entre les individus.

Dans ce contexte, mes hypothèses sont 1) qu'une caractérisation immunohistochimique de la protéine Tau est nécessaire puisque les méthodes présentement utilisées pour sa caractérisation varient beaucoup et ne sont pas nécessairement optimales pour son observation par immunohistochimie ou immunofluorescence et 2) que la maladie de Huntington est bel et bien une Tauopathie secondaire chez l'humain due à une hyperphosphorylation et une déficience de l'épissage alternatif dans les stades avancés de la maladie.

2. Objectif général

L'objectif de ce mémoire est de caractériser la protéine Tau de manières immunohistochimiques et biochimiques dans le contexte de deux Tauopathies, soit la MA pour caractériser de manière immunohistochimique la protéine Tau murine et la MH pour caractériser biochimiquement la protéine Tau humaine.

2.1 Premier objectif

Le premier volet de ce mémoire consiste à comparer différentes méthodes de préparation et de fixation pour l'étude de la protéine Tau par immunohistochimie dans différents modèles murins. Les souris utilisées sont des souris *wild-type*, simulant des conditions physiologiques, et des souris transgéniques comme les hTau et les P301S possédant des mutations résultant en une pathologie Tau. Les souris Tau *knock-out* (TKO) sont également utilisées comme contrôles négatifs en raison de leur absence de protéine Tau. Ce premier objectif a pour but de comparer les méthodes de sacrifice des souris (perfusion intracardiaque et décapitation), le fixateur utilisé (Bouin et PFA 4%) et la température de ce fixateur (4°C ou température pièce) afin d'évaluer leur impact sur l'observation de la phosphorylation, de l'agrégation et de la forme totale de Tau en conditions physiologiques et pathologiques.

2.2 Deuxième objectif

La deuxième partie de ce mémoire vise à étudier la phosphorylation et l'épissage alternatif de la protéine dans la maladie de Huntington chez l'humain. Pour ce faire, des cerveaux post-mortem d'individus atteints de cette maladie sont utilisés pour valider les anomalies au niveau de la phosphorylation et de l'épissage alternatif de la protéine Tau, mais cette fois dans une cohorte de plus de 50 individus atteints de la maladie de Huntington. Ce deuxième objectif a pour but d'analyser les niveaux de phosphorylation dans les différents stades de la maladie ainsi que les niveaux des isoformes afin de confirmer notre hypothèse de Tauopathie secondaire.

Chapitre 2 : Comparaison de différentes méthodes de préparation pour l'étude de la protéine Tau par immunohistochimie

Comparison of various preparation methods for the study of tau protein phosphorylation by immunohistochemistry in paraffin-embedded sections

Andréanne Turgeon^{1,3}, Maud Gratuze^{2,3}, Françoise Morin³, Sébastien S. Hébert^{2,3}, Emmanuel Planel^{2,3}

1 Université Laval, Faculté de Médecine, Département de Biologie Moléculaire, de Biochimie Médicale et de Pathologie, Québec, QC, Canada

2 Université Laval, Faculté de Médecine, Département de Psychiatrie et Neurosciences, Québec, QC, Canada

3 Centre de Recherche du CHU de Québec – Université Laval, Axe Neurosciences, Québec, QC, Canada

***Corresponding author**

Dr. Emmanuel Planel

Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval

2705, boul. Laurier

Neurosciences, P-09800

Québec, QC, Canada

G1V 4G2

Email: emmanuel@planel.org

Phone: 1-418-525-4444 (Ext: 47805)

Fax: 1-418-654-2753

1. Résumé

Pour étudier la protéine Tau, des cerveaux de souris sont analysés par immunohistochimie. Cependant, la meilleure méthode de fixation reste inconnue. L'objectif était de comparer différentes méthodes de fixation pour obtenir les meilleurs résultats par immunohistochimie. Nous avons utilisé quatre lignées de souris et comparé la fixation de cerveaux murins avec le Bouin ou le paraformaldéhyde (PFA) 4%, la température du fixateur et la perfusion. Nos résultats indiquent que 1) le PFA fixe faiblement Tau normale dans les souris WT, 2) le PFA révèle la Tau pathologique dans les souris transgéniques, 3) la fixation à 4°C est meilleure pour préserver les phospho-épitopes de Tau, 4) le Bouin est le meilleur fixateur pour observer Tau dans les souris WT et, 5) la perfusion diminue le signal de Tau phosphorylée. En conclusion, nos résultats montrent l'importance de choisir la bonne méthode de fixation pour la protéine Tau afin d'obtenir de meilleurs résultats.

Dans le cadre de ce projet de recherche, j'ai effectué la prise de température des souris, la prise de poids, l'anesthésie, la décapitation, les perfusions intracardiaques et la récupération des cerveaux. J'ai aussi réalisé les techniques d'immunohistochimie et d'immunofluorescence sur les cerveaux murins, puis les analyses au microscope et l'interprétation des résultats. J'ai ensuite préparé les figures de l'article, puis j'ai rédigé la première version de cet article.

2. Abstract

Hyperphosphorylation and aggregation of Tau protein is a histological and pathological marker of Alzheimer disease. To study the phosphorylation of Tau, brain of mice models are often examined by immunohistochemistry. However, the best method of fixation is not known. The objective of this study was to compare different fixation and sectioning methods to determine which one gives the best results by immunohistochemistry. Four different mouse lines were used: non-transgenic mice (B6 model), mice with a mutation on Tau protein (P301S model), TKO mice without tau protein and hTau mice (a model of AD-like Tau pathology). We first compared fixation by immersion of non-transgenic mouse brains (with or without hypothermia-induced tau hyperphosphorylation) in Bouin's solution or in 4% paraformaldehyde (PFA). Both methods were tested with or without saline perfusion before fixation, and brain fixation was performed at either 4°C or at room temperature. Paraffin embedding and sectioning followed. Our results indicate that i) PFA is poor at fixing normal tau in non-transgenic mice, especially axonal tau in the neuropil, ii) PFA fixation is good at revealing pathological tau in transgenic mice as it does not fix normal tau and thus offers good contrast with neuropil, iii) fixation at 4°C is best to preserve tau phospho-epitopes and, iv) fixation in Bouin is better to preserve axonal tau and is the best method for revealing tau in non-transgenic mice. We also observed that perfusion before fixation decreased phospho-tau signal compared to drop-fix. In conclusion, our results show the importance of choosing the right fixation method for the study of tau protein to be able to see optimal signal of phosphorylation and obtain better results.

Keywords: tau, immunohistochemistry, fixation, Bouin, paraformaldehyde, staining

3. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is an incurable neurodegenerative disorder associated with a progressive cognitive impairment and dementia (Avila et al., 2004). AD is characterized by the presence of extracellular senile plaques composed of beta-amyloid protein and neurofibrillary tangles (NFTs) within the brain (Sindou et al., 1992). NFTs are formed of aggregates of hyperphosphorylated tau protein. Tau is an axonal microtubule-associated protein playing a role in the stabilisation of microtubules, and this function is regulated by its splicing and its phosphorylation on more than 80 sites (Goedert et al., 1989). Its hyperphosphorylation in pathological condition reduce its affinity for microtubules, and is thought to lead to aggregation and neuronal dysfunction (Fath et al., 2002).

Tau physiological regulation or deregulation in pathological condition is often investigated by immunohistochemistry in mice, either wild-type or transgenic (Kremer et al., 2011). To perform this technique, brains of mice must be fixed with a fixative to preserve fresh tissue components and to prevent degradation process (Howat and Wilson, 2014). They can be physical or chemical, and cause denaturation, coagulation or cross-linking of proteins (Pikkarainen et al., 2010). Fixatives such as Bouin's solution (picric acid, formalin and glacial acetic acid in a ratio of 15:5:1) and paraformaldehyde (PFA) 4% are commonly used in research (Kremer et al., 2011). Having the right fixative is therefore important for techniques such as immunohistochemistry for conservation of the phosphorylation of proteins and a better staining for their study.

However, the best methods and conditions of fixation (fixative, temperature, etc.) for tau protein in mice and preservation of its state of phosphorylation are not known. Many laboratories have problems with the observation of hyperphosphorylated tau, and different fixation methods and conditions are used (Braak et al., 2006).

The objective of this study was to compare different fixation and sectioning methods to determine which one gives the best results when it comes to the observation of tau by immunohistochemistry. To do so, three different mouse lines were used: non-transgenic

wild-type mice (C57BL6/10J model), hTau mice expressing human tau without mutation on a murine Tau KO background and tau knock-out mice (TKO) without murine tau gene as a negative control. We compared fixation by immersion of non-transgenic mouse brains (with or without hyperphosphorylation) in Bouin's solution with brains in PFA 4%. Both methods were tested with or without saline perfusion before fixation, and brain fixation was performed at either 4°C or at room temperature. Paraffin embedding and sectioning was following.

Our results indicated that fixation by immersion with Bouin kept at 4°C seems to be the best method to observe tau phosphorylation and avoid degradation. We also noted that perfusion before fixation gave poor results due to dephosphorylation of proteins in post-mortem brain.

4. Material and Methods

4.1 Animals

Animals were handled according to procedures approved by the Comité de Protection des Animaux du CHU under the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Mice were maintained in a temperature-controlled room (~23°C) with a light/dark cycle of 12/12h. Experiments were performed during the light period and all animals had access to food and water *ad libitum*. Four groups of were used: WT, P301S, TKO and hTau mice. WT mice (C57BL/10J, #000665, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) are used as non-transgenic controls to observe tau phosphorylation. P301S mice (B6;C3-Tg(prnp-MAPT*P301S)PS19Vle/J, #008169, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were used as transgenic mice model, the latter showing widespread neurofibrillary tangles and tau pathology. TKO mice (Mapt^{tm1(EGFP)Klt}/J, #004779, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were used as negative controls for phosphorylation and aggregation due to the absence of tau protein. These mice have a knock-in in the first exon of *MAPT* gene, disrupting its expression. hTau mice (B6.Cg-Mapt^{tm1(EGFP)Klt}-Tg(MAPT)8cPdav/J, #005491, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), result of mating of 8c mice and tau knock-out mice, are designed to only express human tau isoforms on a murine tau knock-out background. This line was used in this study to compare the phosphorylation of mice tau with human tau, depending the fixation method. Half of the mice were hypothermic and were used as a positive control for tau hyperphosphorylation. Hypothermic mice were put in a chamber with isoflurane for anesthesia to induce hypothermia-mediated tau hyperphosphorylation.

4.2 Fixation

Hypothermic mice were killed by decapitation when their body temperature was low enough (under 30°C) after anesthesia or transcardially perfused with a saline solution 0.9% for this condition. Non-hypothermic mice were killed by decapitation without anesthesia to avoid hyperphosphorylation. For the comparison between Bouin and PFA, both hypothermic and non-hypothermic mice (WT, TKO and hTau) that were killed by

decapitation without perfusion had their brain immediately removed and cut in half, one hemisphere being drop-fixed in Bouin and the other in PFA 4%. When the effect of perfusion was studied, mice were briefly put in isoflurane chamber until completely anaesthetised. Then, their body temperature was monitored using a rectal probe (Thermalert TH-5, Physitemp, Clifton, NJ, USA) to make sure they are not hypothermic and rapidly perfused with a saline solution 0.9%. Then, the brain was removed and each half-hemisphere were drop-fixed in each fixative. Brains were cut in half on ice, and half of each fixatives was kept ice-cold (4°C) and the other half at room temperature. Brains were kept in fixative on a rotarod for 24h, followed by three washes of PBS 0.1M pH 7.4. Brains were embedded in paraffin blocks and 10 µm thick sagittal sections were processed for immunostaining analyses.

4.3 Immunohistochemistry

Prior to immunostaining, slides were warmed at 60°C for 10 minutes and deparaffinised with Citrisolv (22-143-975, Fisherbrand) for 2 x 10 minutes. Rehydration of sections was made by immersion in graded ethanol solutions (100%, 95%, 70% and 50%) for 5 minutes each. After rinses in distilled water, antigen retrieval was performed by incubating slides in citrate buffer pH 6.2 for 30 minutes at 80°C, then letting slides cool down for about 1h at room temperature. Three washes of 8 minutes in PBS 0.2M pH 7.4 followed, then the slides were quenched with endogenous peroxidases using a solution of PBS containing 3% of peroxide for 30 minutes, and washed again in PBS for 3 x 8 minutes. Non-specific background staining was blocked for 1h in a solution of PBS consisting of 4% normal goat serum, 4% Triton X-100 10% and 1% bovine serum albumin. Sections were incubated overnight at 4°C in primary antibodies (mouse anti-CP13 (phospho S202), 1:200 dilution [Peter Davies]; mouse anti-AT8 (phospho S202/T205), 1:200 dilution [MN1020, Thermo Fisher Scientific]; mouse anti-PHF1 (phospho S396/404), 1:20 dilution [Peter Davies]; mouse anti-MC1, 1:25 dilution [Peter Davies]; rabbit anti-TauC (total Tau), 1:1000 dilution [A0024, Dako]) diluted in a solution of PBS with 1% normal goat serum and 0.4% Triton X-100 10%. The sections were afterwards washed in PBS 3 x 8 minutes and incubated with the appropriate biotinylated secondary antibody (biotinylated goat anti-mouse, 1:1500

dilution [BA-9200, Vector Laboratories]; biotinylated goat anti-rabbit, 1:1500 dilution [BA-1000, Vector Laboratories]). Tissues were washed again in PBS 3 x 8 minutes and incubated with avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit, PK-6100, Vector Laboratories) for 1h. Washes with PBS 3 x 8 minutes followed, and sections were washed with Tris-HCl 0.05M pH 7.6 for 5 minutes. Visualisation was made with 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride, also known as DAB (D5905, Sigma-Aldrich) in 0.05% hydrogen peroxide and Tris-HCl. Sections were washed again in PBS 3 x 8 minutes, rehydrated in graded ethanol solutions (50%, 70%, 95%, 100%), then Citrisolv and finally mounted with Neo-Mount anhydrous mounting medium (1.09016.0500, Millipore). Immunolabeled tissues were observed under a Carl Zeiss AxioCamIC (Carl Zeiss, Jena, Germany) microscope.

4.4 Immunofluorescence

Paraffin-embedded sections of mice brains were warmed at 60°C for 10 minutes and deparaffinised with Citrisolv for 2 x 10 minutes. Rehydration of sections was made by immersion in graded ethanol solutions (100%, 95%, 70% and 50%) for 5 minutes each. After rinses in distilled water, antigen retrieval was performed by incubating slides in citrate buffer pH 6.2 for 30 minutes at 80°C, then letting slides cool down for about 1h at room temperature. Three washes of 8 minutes in PBS 0.2M pH 7.4 followed, then non-specific background staining was blocked for 1h in a solution of PBS consisting of 4% normal goat serum, 4% Triton X-100 10% and 1% bovine serum albumin. Sections were incubated overnight at 4°C in primary antibodies (mouse anti-CP13 (phospho S202), 1:200 dilution [Peter Davies]; mouse anti-AT8 (phospho S202/T205), 1:200 dilution [MN1020, Thermo Fisher Scientific]; mouse anti-PHF1 (phospho S396/404), 1:20 dilution [Peter Davies]; mouse anti-MC1, 1:25 dilution [Peter Davies]; rabbit anti-TauC (total Tau), 1:1000 dilution [A0024, Dako]) diluted in a solution of PBS with 1% normal goat serum and 0.4% Triton X-100 10%. The sections were next washed in PBS 3 x 8 minutes and incubated with the appropriate fluorophore-conjugated secondary antibody (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, 1:1500 [A11029, Life Technologies]; Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG, 1:1500 [A11031, Life Technologies]; Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG,

1:1500 [A11034, Invitrogen]; Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG, 1:1500 [A11036, Invitrogen]). Tissues were washed again in PBS 3 x 8 minutes and incubated in a solution of PBS containing DAPI (D3571, Life Technologies) for 15 minutes. Sections were washed in PBS for 8 minutes, then in ethanol 50% for 5 minutes and covered with Autofluorescence Eliminator Reagent (2160, EMD Millipore) protected from light for 5 minutes. Slides were washed with ethanol 70% for 3 x 1 minute and mounted with Fluoromount-G (0100-01, Southern Biotech). Immunolabeled tissues were observed under a Carl Zeiss AxioCamIC microscope.

5. Results

5.1 Fixation with Bouin at 4°C is more effective to visualize tau in WT mice

To determine which parameters of fixation are the best, we compared three different parameters: the type of fixative, its temperature and the effect of perfusion for the study of tau in 3 months WT mice. We first looked at the staining of total tau in this mice model to observe the protein in normal conditions. Since hippocampus is one of the most known regions being affected in AD, we observed precisely the boundary between the fimbria and the CA1 zone with the 20X objective, where tau phosphorylation and pathology are mainly seen. In immunofluorescence, the perfusion do not seem to influence the staining of total tau, but we can observe a more intense staining with fixation with Bouin compared to PFA 4% (figure 4). Also, the staining at 4°C in both fixative is better than at RT, and the best conditions for the observation of total tau in WT mice would be with Bouin at 4°C. In immunohistochemistry, since DAB is not as quantitative as fluorescence, it is more difficult to see the difference of staining between perfused and non-perfused animals (figure 5). However, we can also see that the fixation with Bouin results in a better staining than with PFA 4%, and that the fixative at 4°C gives better results. If we look at a higher magnification (20X), it is possible to see that not only the staining is better with Bouin at 4°C, but Bouin preserves the structure compared to PFA 4%. In these microphotographs, we can clearly see the dendritic tracks of pyramidal cells of the hippocampus and the unmyelinated axons of the mossy fibers that stain darker with tau.

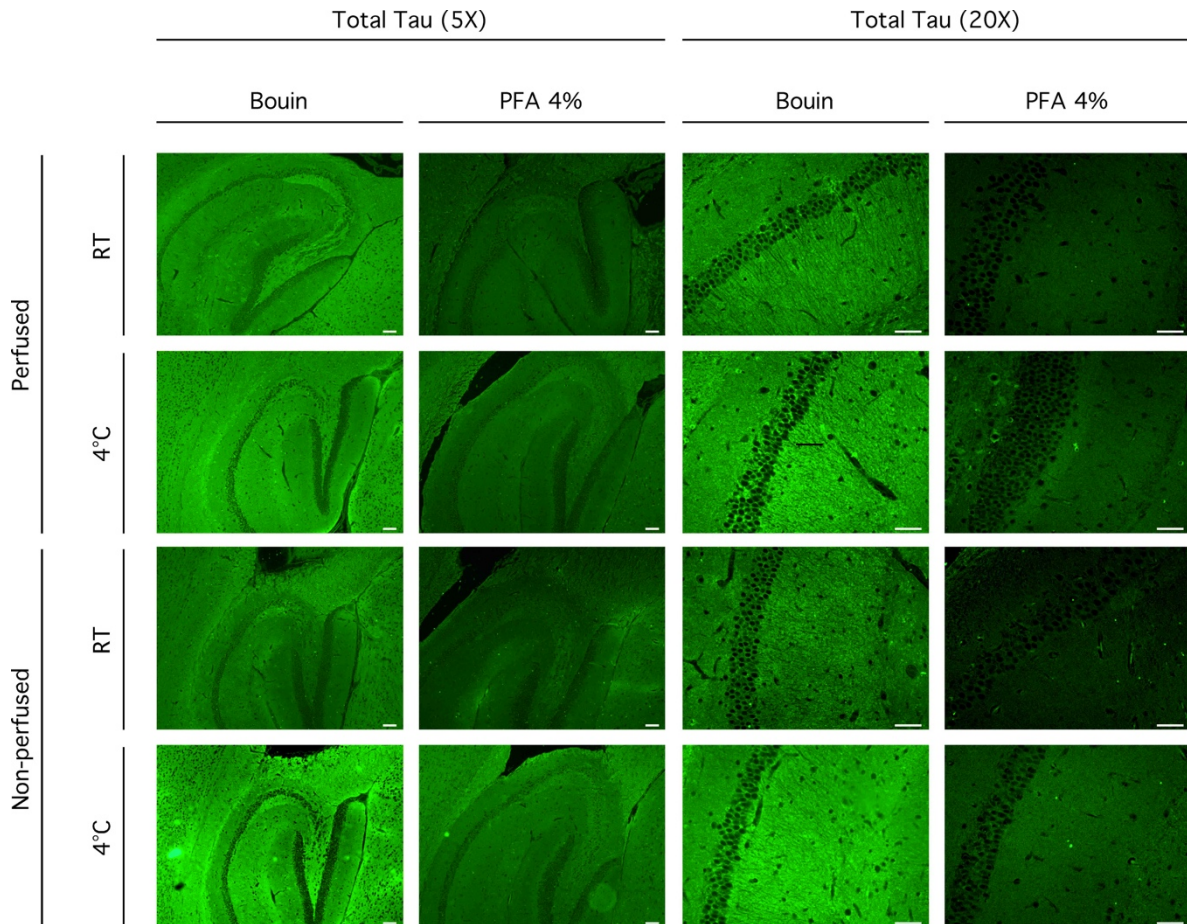


Figure 4. Total Tau staining by fluorescence in WT mice. Sagittal sections (5X and 20X) of WT mice hippocampi are shown using TauC antibody in immunofluorescence (green) for the following conditions: Bouin at 4°C, Bouin at RT, PFA 4% at 4°C and PFA 4% at RT, all with or without perfusion. Scale bar, 5X: 50 µm, 20X: 100 µm.

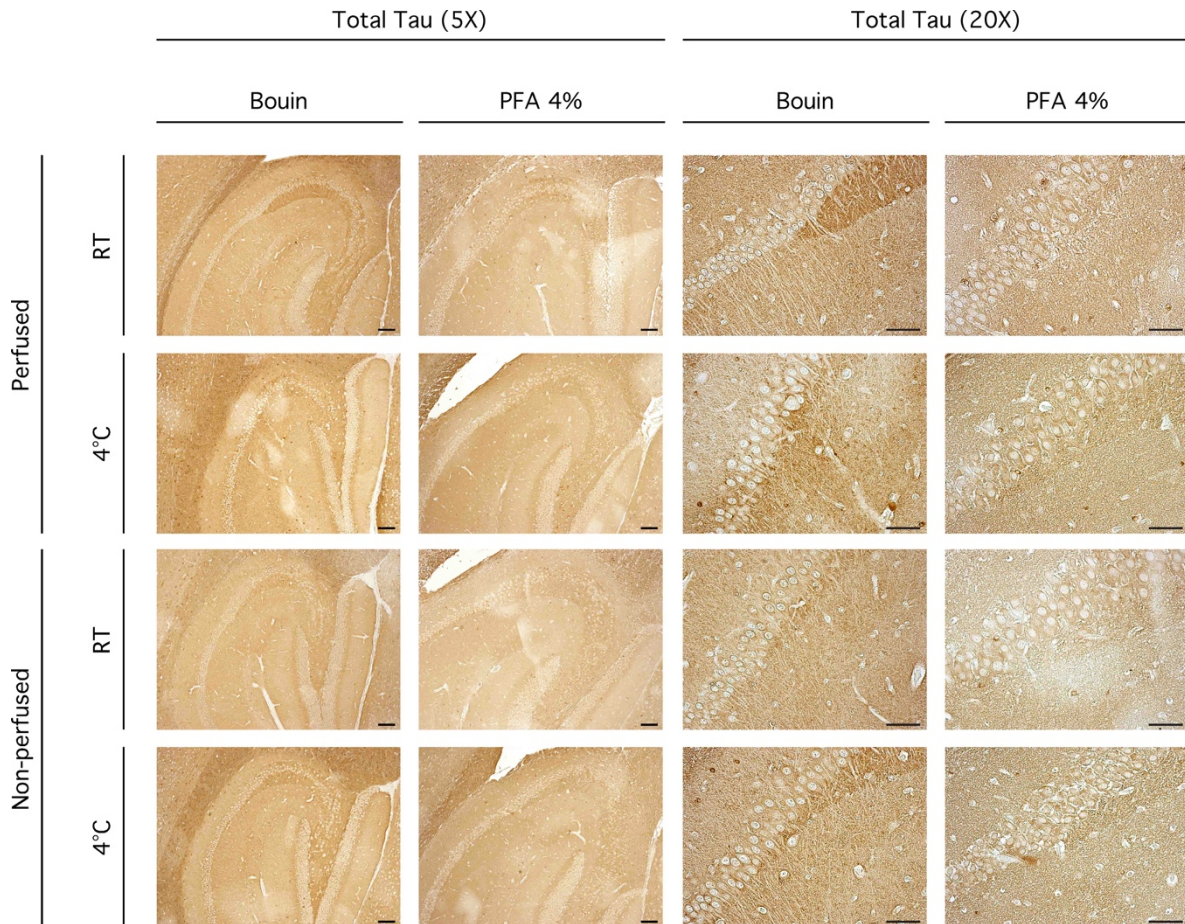


Figure 5. Total Tau staining by DAB in WT mice. Sagittal sections (5X and 20X) of WT mice hippocampi are shown using TauC antibody in immunohistochemistry (DAB) for the following conditions: Bouin at 4°C, Bouin at RT, PFA 4% at 4°C and PFA 4% at RT, all with or without perfusion. Scale bar, 5X: 50 µm, 20X: 100 µm.

When comparing the staining of both fixatives, the cell body of neurons seemed to be smaller in brains fixed with Bouin in comparison with PFA 4%. We can also observe under the microscope that brain structures seemed to shrink only with the use of Bouin as a fixative, while the fixation with PFA 4% seemed to preserve the original size of neurons.

5.2 Bouin at 4°C allows better preservation of tau phosphorylation

We next assessed the phosphorylation of tau in the hippocampus of WT mice. To do so, we compared the same parameters as mentioned previously (type of fixative, temperature and perfusion) and used phospho-tau antibodies in immunohistochemistry. We looked at the

phosphorylation of S396/404 with the antibody PHF1 in perfused WT mice (figure 6). Normothermic mice were compared with hypothermic mice, the latter being used as a positive control for tau hyperphosphorylation (Planel et al., 2007). Only the fixative and its temperature were compared here, all the mice being perfused for the experiment. It is possible to observe that again Bouin had a better staining than PFA 4%, and that 4°C was better than RT. We can note that staining is better in hypothermic versus normothermic mice, and that hyperphosphorylation is clearly present in these mice, resulting in a darker staining of PHF1.

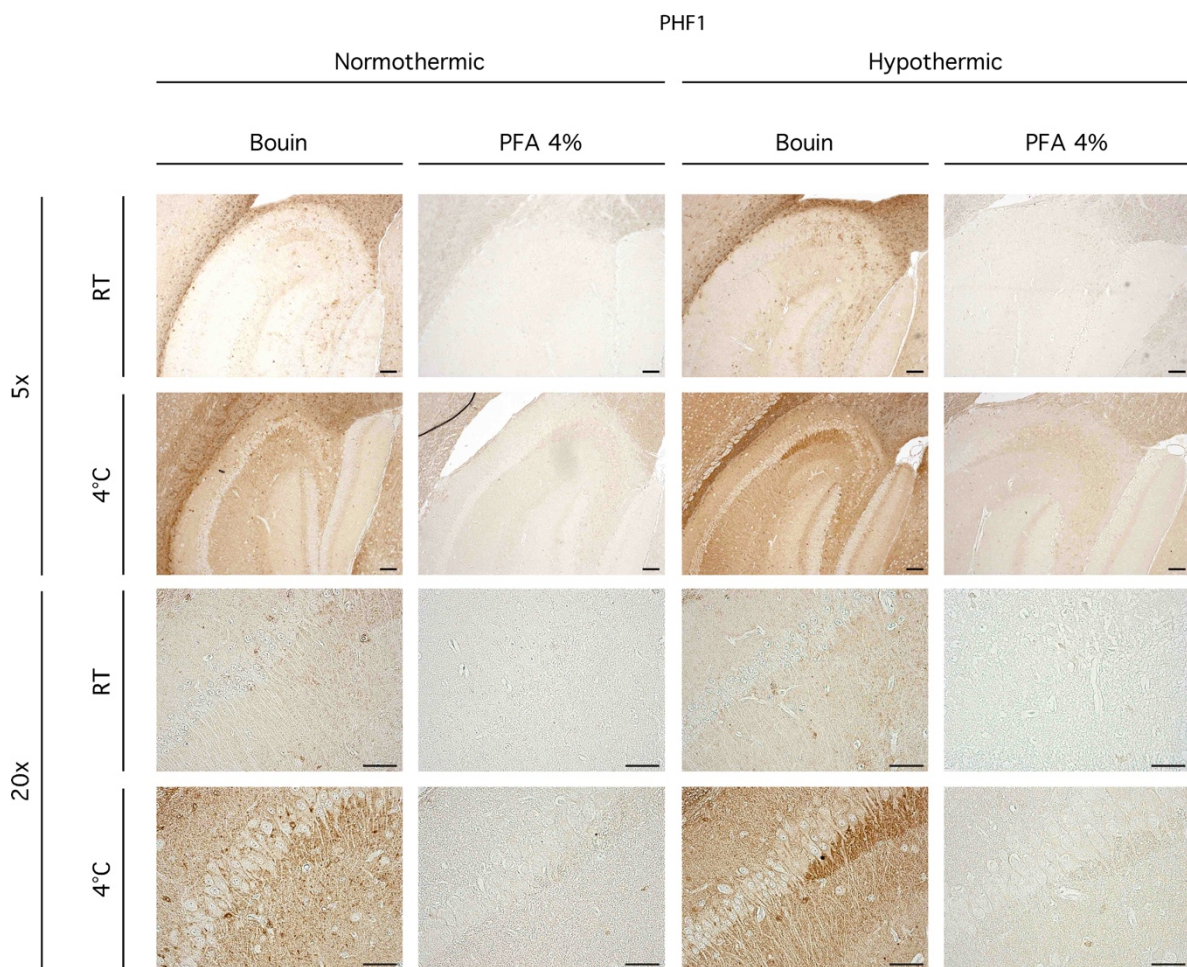


Figure 6. PHF1 staining by DAB in perfused WT mice. Sagittal sections (5X and 20X) of WT mice hippocampi are shown using PHF1 antibody (phospho S396/S404) in immunohistochemistry (DAB) for the following conditions: Bouin at 4°C, Bouin at RT, PFA 4% at 4°C and PFA 4% at RT, all perfused. Scale bar, 5X: 50 µm, 20X: 100 µm.

We also investigated tau phosphorylation using AT8 antibody, which recognize the epitopes S202 and T205 (figure 7). We compared control mice to hypothermic mice. We can observe that there is weak staining for control mice no matter the fixative or the temperature (figure 7A, C, E), which is in accordance to the fact that this epitope is weakly phosphorylated in normal mice. The only condition showing staining for hypothermic mice is with Bouin at 4°C (figure 7B, D, F). Hyperphosphorylation in these mice was confirmed by Western blot (figure 7G, H), where control mice show few or no phosphorylation compared to hypothermia-induced starved mice.

AT8 staining

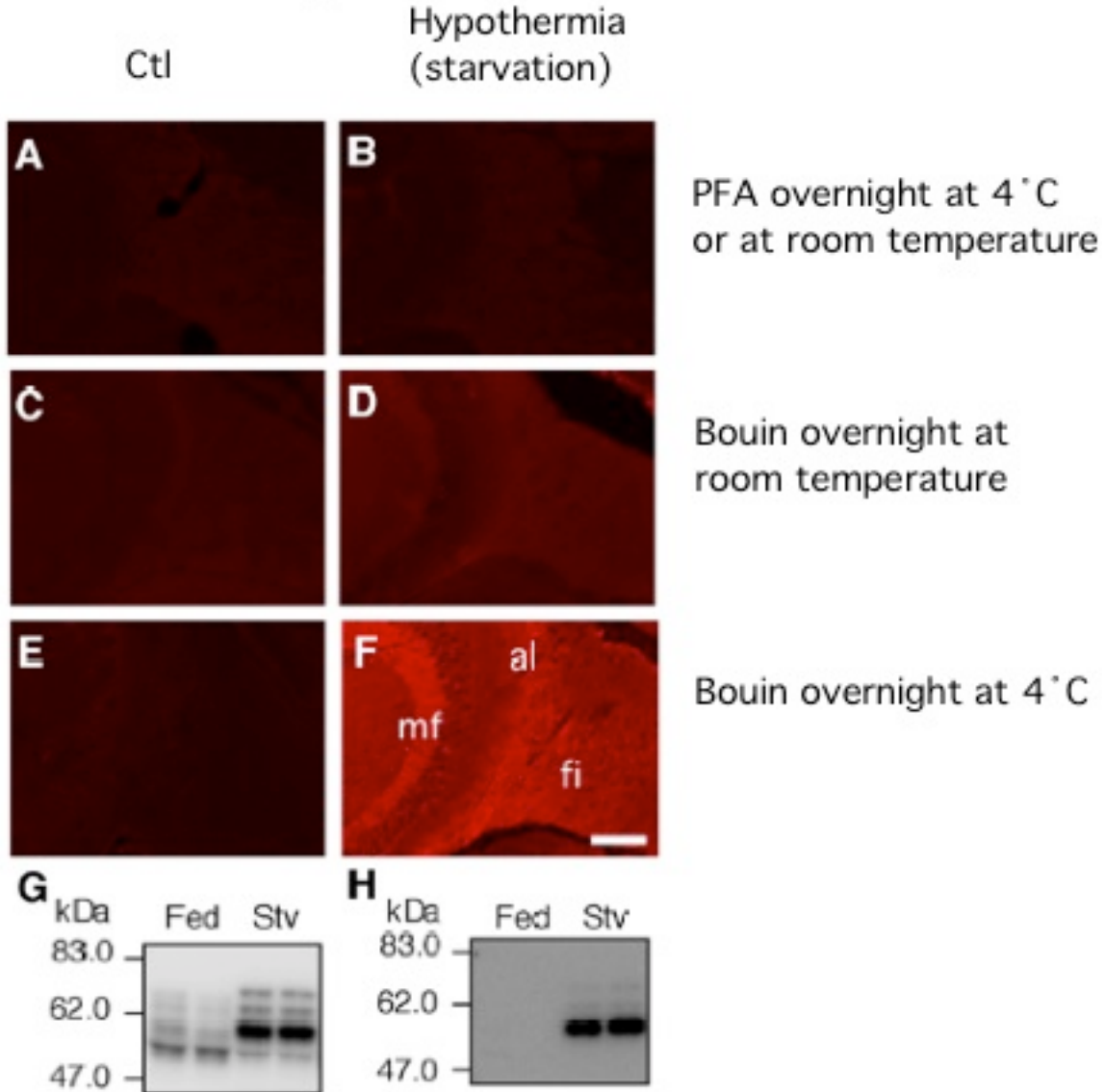


Figure 7. Observation of Tau phosphorylation in condition of hyperphosphorylation. Sagittal sections (10X) of a region including the alveus, the fimbriae and a part of the hippocampus are shown with AT8 (red) for the following conditions: PFA 4% at 4°C or RT, Bouin at RT and Bouin at 4°C, for control mice (**A, C, E**) and hypothermic mice (**B, D, F**). Hyperphosphorylation in starved mice was confirmed by Western blot (**G, H**). mf: mossy fibers; al: alveus; fi: fimbriae; Fed: control mice; Stv: starved mice.

To explain the difference of temperature on tau phosphorylation, we next observed dephosphorylation in post-mortem brains by Western blot. Post-mortem dephosphorylation in WT mice at RT and 4°C was observed at different times with a total tau (MS06) and two phospho-tau (AT8 and pS404) antibodies (figure 8). As demonstrated by Western blot, phosphorylation and levels of tau rapidly decrease at RT, whereas there is no more phosphorylation at S202/T205 after 60 minutes. Even after only 7 minutes, it is possible to see a lower signal for AT8. Phosphorylation and protein levels did not significantly change even after 60 minutes for the three antibodies at a temperature of 4°C.

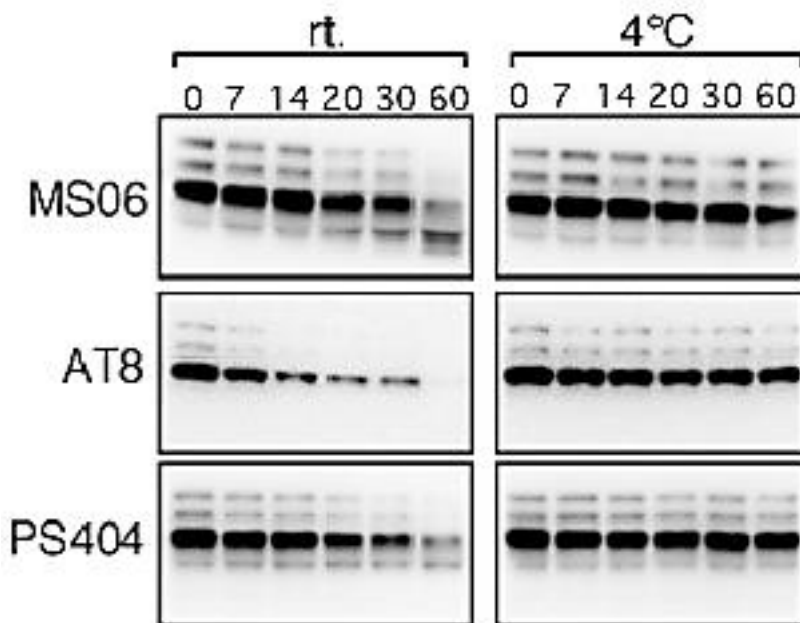


Figure 8. Post-mortem dephosphorylation as a function of time. Phosphorylation levels were compared by Western blot using MS06, AT8 and pS404 antibodies at 0, 7, 14, 20, 30 and 60 minutes post-mortem for two different temperatures, RT and 4°C.

To confirm the results that the staining is better with Bouin for the observation of tau phosphorylation, we used hTau transgenic mice, which express human Tau protein without mutation on a murine tau knockout background. Therefore, we analysed CP27 (recognizing human tau), CP13 (S202) and PHF1 (S396/404) on hTau mice as well as on hTau hypothermic mice as a positive control and TKO mice as a negative control. All mice were not perfused and brains were drop-fixed in fixative at 4°C for a better staining as previously shown. For CP27, staining was better with Bouin, showing a significantly weaker staining

of neuropil with PFA 4% which seemed to stain only some neurons within the fimbria and not in the CA1 zone of the hippocampus (figure 9). CP13 (figure 10) and PHF1 (figure 11) showed also a better staining with Bouin and a better definition of the dendrites than with PFA 4%. However, since the neuropil staining was weak with PFA 4%, the accumulation of tau in neurons was more visible. In all cases, TKO mice did not show any staining, meaning that the staining observed in hTau mice is specific signal.

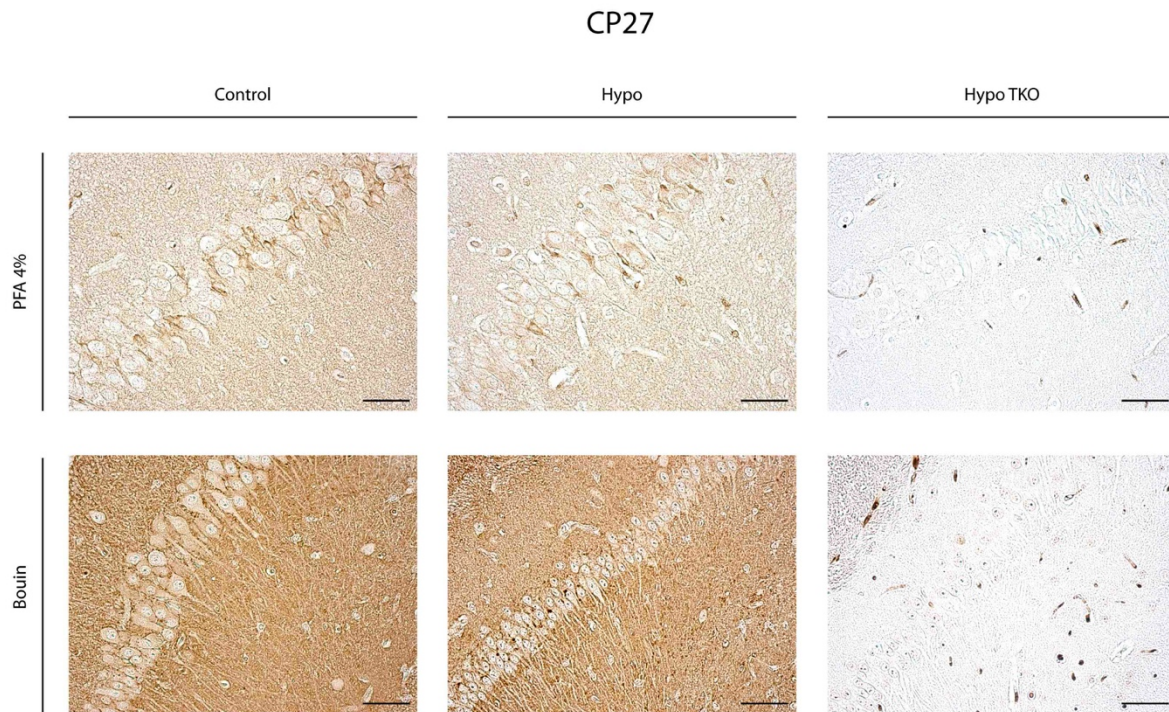


Figure 9. CP27 staining by DAB in hTau and TKO mice. Sagittal sections (20X) of hTau and TKO mice hippocampi are shown using CP27 (human tau) antibody in immunohistochemistry (DAB) with Bouin and PFA 4%, both at 4°C and without perfusion. Control: hTau mice; Hypo: hypothermic hTau mice; Hypo TKO: hypothermic Tau knockout mice. Scale bar, 5X: 50 µm, 20X: 100 µm.

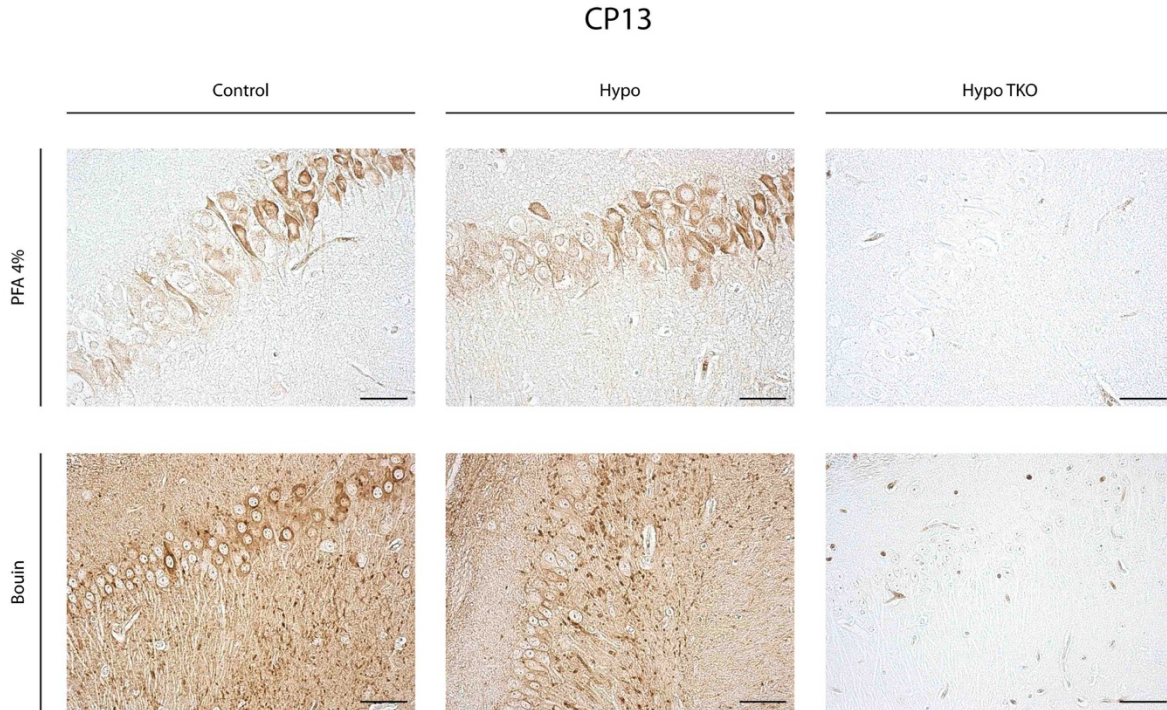


Figure 10. CP13 staining by DAB in hTau and TKO mice. Sagittal sections (20X) of hTau and TKO mice hippocampi are shown using CP13 (phospho S202) antibody in immunohistochemistry (DAB) with Bouin and PFA 4%, both at 4°C and without perfusion. Control: hTau mice; Hypo: hypothermic hTau mice; Hypo TKO: hypothermic Tau knockout mice. Scale bar, 5X: 50 μ m, 20X: 100 μ m.

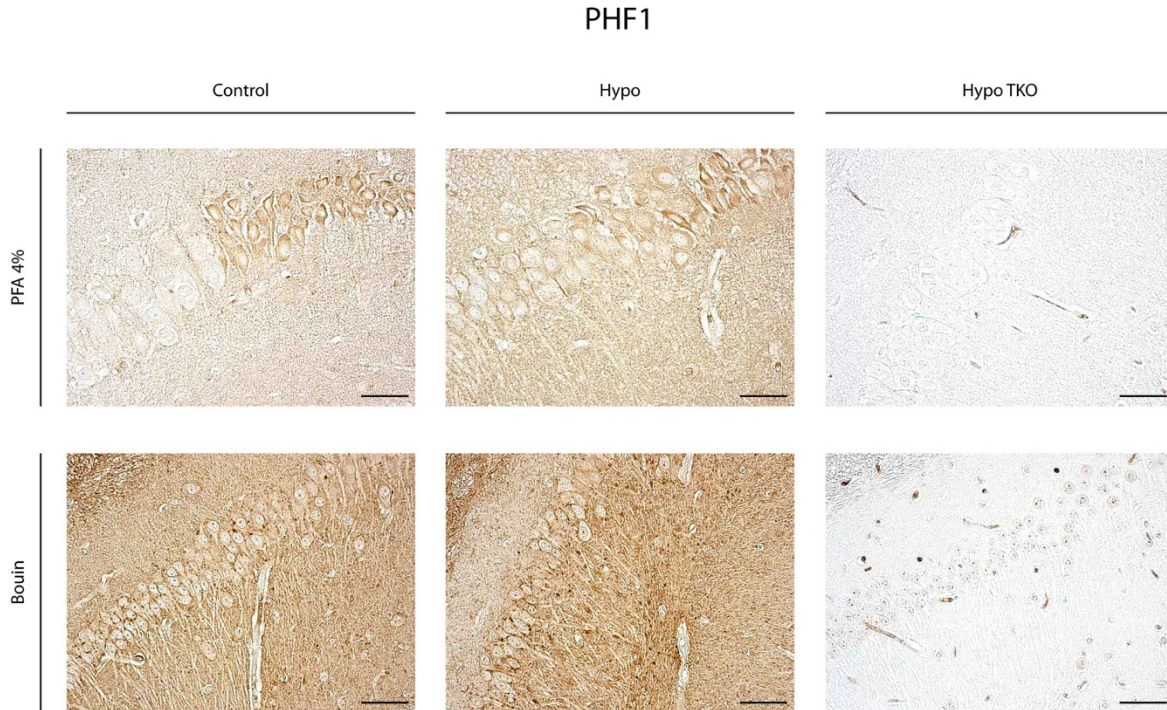


Figure 11. PHF1 staining by DAB in hTau and TKO mice. Sagittal sections (20X) of hTau and TKO mice hippocampi are shown using PHF1 (phospho S396/404) antibody in immunohistochemistry (DAB) with Bouin and PFA 4%, both at 4°C and without perfusion. Control: hTau mice; Hypo: hypothermic hTau mice; Hypo TKO: hypothermic Tau knockout mice. Scale bar, 5X: 50 µm, 20X: 100 µm.

5.3 Perfusion affects tau phosphorylation

To investigate the effect of mice perfusion on tau phosphorylation, we used non-transgenic control (P301S-) and transgenic P301S mice (P301S+), which is a pathological model with a mutation on overexpressed human tau. Mice were perfused or only drop-fixed with PFA 4% at 4°C, and we looked at the phosphorylation (AT8), aggregation (MC1) and levels (TauC) of tau protein in each condition, therefore perfused or non-perfused for both type of mice (figure 12). P301S- mice served as negative control as there is no mutation on murine protein leading to hyperphosphorylation and aggregation of tau, contrary to P301S+ mice. There is a better staining of phosphorylated tau on S202/T205 without perfusion compared to staining obtained for perfused P301S+ mice. On the other hand, there is no significant difference between staining for perfused or non-perfused mice with MC1 antibody, which recognize an abnormal conformational change of tau. As expected, there is no staining in

P301S- mice, which normally do not have aggregated tau. Regarding the staining of total tau, we do not see any major difference with this model for the expression of total tau between perfused and non-perfused mice.

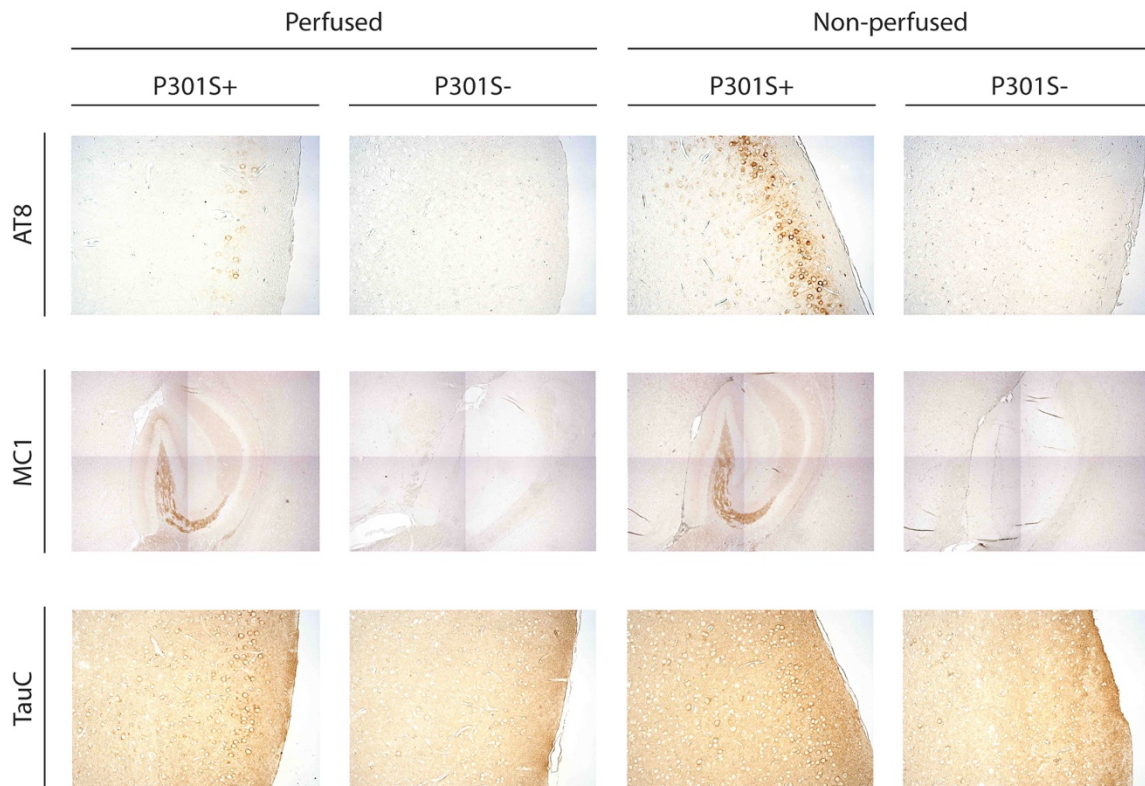


Figure 12. Observation of the effect of perfusion on phosphorylation in transgenic mice. Sagittal sections (10X for AT8 and TauC, 5X for MC1) of P301S mice are shown using AT8, MC1 and TauC antibody with DAB for the following conditions: control (P301S-) or transgenic (P301S+), with and without perfusion for each.

6. Discussion

In the present study, we demonstrated that fixation with Bouin's solution seemed to be the best method for the observation of total tau and tau phosphorylation in normal mice brains. Not only the overall staining was better compared to PFA 4%, but it also preserved the structure of the dendrites in the CA1 zone and the fimbriae in the hippocampus at a higher magnification. The difference is more obvious while looking at the phosphorylation of tau comparing both of the fixative. For both Bouin and PFA 4%, there is a neuropil staining occurring when we observed total tau. However, the neuropil is only stained when using Bouin as a fixative for the observation of phospho-tau antibodies. The neuropil is a synaptically dense region with few cell bodies composed of unmyelinated axons, glial cell processes and dendrites (Spocter et al., 2012). Neuropil threads and NTFs are together called neurofibrillary changes and are a pathological hallmark of AD, exhibiting a pattern of progression around the hippocampus (Uematsu et al., 2018). These neurofibrillary changes are immunoreactive principally for the hyperphosphorylated form of tau. This could mean that Bouin is more effective than PFA 4% when it comes to the staining of phosphorylated tau and thus a better observation by immunohistochemistry. Since neurofibrillary changes are hallmarks of AD, Bouin could be the best fixative to use for the study of AD in different mice models by immunohistochemistry.

Variation in fixatives and tissue processing techniques can affect the immunological staining obtained in our study (Berod et al., 1981; Orstavik et al., 1981). These variations could be due to antigen alteration, loss or inaccessibility caused by the techniques employed on the tissue (Culling et al., 1980; Consolazione et al., 1981). It is also known that Bouin's solution provides an optimal preservation of neurofilaments antigens compared to other fixatives (Hickey et al., 1983; Trojanowski et al., 1986; Schmidt et al., 1987). Furthermore, a study from Trojanowski and collaborators previously showed that the distribution of tau in a normal brain is affected by the method of fixation used (Trojanowski et al., 1989). They compared different methods, and Bouin was better than PFA for non-pathological human tissue fixation whereas samples of central and peripheral nervous systems tissues fixed by immersion in neutral buffered formalin reacted poorly

with monoclonal antibodies against tau (Grundke-Iqbal et al., 1986b; Kosik et al., 1986; Joachim et al., 1987). This could explain why fixation with Bouin results in a better staining of tau than with PFA 4%.

Better staining by Bouin compared to PFA 4% could be due to the composition of the fixative. Indeed, Bouin's solution is made of picric acid, formalin and acetic acid. Some fixatives incorporate picric acid, acetic acid, mercuric acid or tannic acid to increase tissue penetration and thus having a higher coefficient of diffusibility, which is the case of Bouin, showing a faster penetration than PFA 4% (Srinivasan et al., 2002). Bouin has both a coagulative and a cross-linking effect on proteins, and also have a higher concentration of formaldehyde or formalin (approximately 10%), which is higher than PFA 4% which only causes cross-linking (Howat and Wilson, 2014). A faster fixation means less protein degradation and less dephosphorylation occurring in regions that are in the center of the brain, including the hippocampus.

The staining obtained in WT mice with both fixatives is different that the staining observed in hTau mice. The fixation with PFA 4% leads to a better observation of tau in neurons in hTau mice compared to WT mice. This could be probably due to the fact that hTau mice contain aggregated tau relocated in the somatodendritic compartment in pathology. PFA 4% could then fix a form of aggregated and pathological tau whereas neuropil tau is not fixed. On the other hand, Bouin seems to fix all tau present in the neuropil and neurons. However, the contrast of staining between neuron and neuropil resulting from fixation with Bouin is quite weak.

We observed that fixation with Bouin resulted in smaller neurons. This shrinkage could be due to the presence of picric acid in the solution, which is partially compensated by the presence of acetic acid normally causing cells swelling. PFA 4% only contains formaldehyde, which causes a slight shrinkage of tissues and a good preservation of cellular structure for many cell types and tissues, leading to the observation of bigger cell bodies and neurons (Thavarajah et al., 2012). Furthermore, the presence of formaldehyde in the

fixative does not seem to cause significant structural changes in proteins (Mason and O'Leary, 1991). However, it can cause an effect of bulge or protrusion to the plasmic membrane and formation of indentations or vacuoles near nuclear or mitochondrial membranes (Fox et al., 1985).

In this study, we showed that fixation with a fixative at 4°C results in a better staining than at RT. The fact that fixative at a temperature of 4°C stains better than at RT is explained by the inhibition of enzymatic activity and protein dephosphorylation. The rapid process of dephosphorylation occurs when the tissue is deprived of oxygen because of the lack of blood supply (Burns et al., 2009). Figure 8 shows that protein and phosphorylation levels did not change at 4°C even after 60 minutes, indicating that there is more stability at this temperature due to the inhibition of endogenous proteases and phosphatases, these being normally active at RT.

Our study also highlighted the effect of perfusion on tau phosphorylation and aggregation. While perfusion did not seem to have an impact on the aggregation of tau in transgenic mice, it had however an effect on tau phosphorylation, making it more difficult to observe than without perfusion. This could be explained by the time it takes to perform the technique, which causes a lack of blood and thus ischemia to the brain, leading to dephosphorylation (Baker et al., 2005). Dephosphorylation occurs rapidly in post-mortem brains due to the action of phosphatases (Wang et al., 2015). In fact, blood should be flushed with PBS before perfusing with the fixative to remove red blood cells in tissues. It does take time to execute, and if the speed of perfusion, fixation and dissection is too slow, dephosphorylation occurs as long as there is no fixative injected in bloodstream. Sacrifices are shorter when there is no perfusion and brains are immediately drop-fixed in fixative, resulting in less dephosphorylation.

In summary, we investigated the impact of the choice of fixative, perfusion and temperature on the observation of tau protein by immunohistochemistry *in vivo* using WT, hTau, TKO and P301S mouse models. We demonstrated that fixation with Bouin at 4°C and without

perfusion provides a better staining of phosphorylated and total tau. Our findings bring a clarification on the best method to use in order to have an optimal staining for the observation of tau by immunohistochemistry. Further studies are needed to determine whether Bouin leads to a definite neuropil staining in other diseases, for example Huntington's disease, a secondary tauopathy in which some recent studies shows that neuropil threads and tau inclusions could be found in various brain regions (Cisbani et al., 2017), and also to observe the staining in other species such as the human brain.

7. Acknowledgment

We would like to thank Dr. Peter Davies (Feinstein Institute for Medical Research, Manhasset, NY, USA) for the gift of tau antibodies. This work was supported by Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS), who gave a scholarship to A.T. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. E.P. is the guarantor of the manuscript presented here and takes full responsibility for the work as a whole, including the study design, access to data and decision to submit and publish the manuscript.

8. Competing interests

The authors declare no competing interests of any sort.

9. Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EP MG AT. Performed the experiments: AT MG FM. Analyzed the data: AT EP. Wrote the paper: AT EP.

Chapitre 3 : Étude de la phosphorylation et de l'épissage alternatif de la protéine Tau humaine dans la maladie de Huntington

1. Résumé

Les résultats présentés dans ce chapitre font partie d'un article dont je suis deuxième auteure :

Co-occurrence of mixed proteinopathies in late-stage Huntington's Disease. St-Amour I, **Turgeon A**, Goupil C, Planel E, Hébert SS. *Acta Neuropathol.* 2018 Feb;135(2):249-265. doi: 10.1007/s00401-017-1786-7

Plusieurs études soulignent le rôle potentiel de différentes protéinopathies (c'est-à-dire l'agrégation anormale de protéines) dans le développement de maladies neurodégénératives, comme la maladie de Huntington (MH). La MH est une maladie neurodégénérative génétique causée par une mutation autosomique dominante d'expansion d'une répétition du trinuécléotide CAG dans le gène codant pour la protéine huntingtine (Htt). Des études précédentes ont suggéré la coexistence d'inclusions de protéine Tau phosphorylée, α -synucléine (α -Syn) et *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43) dans la MH. Cependant, une preuve définitive que la pathologie MH peut être accompagnée d'autres protéinopathies chez l'humain est toujours manquante. En utilisant des échantillons post-mortem de putamens humains de 31 individus contrôles et 56 individus atteints de la MH, nous avons procédé à des analyses biochimiques de l'expression, l'oligomérisation et l'agrégation de Tau, α -Syn, TDP-43 et APP/A β . Dans les cerveaux de patients atteints de la MH, nous avons observé une diminution des niveaux de protéines solubles de Htt, α -Syn et Tau. Nos résultats évoquent aussi une phosphorylation anormale de Tau dans les stades plus avancés de la maladie. Nous avons aussi observé un épissage alternatif aberrant des exons 2, 3 (exclusion) et 10 (inclusion) de la protéine Tau chez les patients atteints de la MH, menant à des niveaux d'isoformes plus élevés de 0N4R et plus faibles de 1N3R. De plus, à la suite des extractions à l'acide formique, nous avons observé une augmentation de l'agrégation de TDP-43, α -Syn et de Tau phosphorylée pendant la progression de la MH. En effet, 88% des patients atteints de la MH avec la neuropathologie de grade 4 de Vonsattel démontraient au moins une protéinopathie non Htt, comparativement à 29% des individus contrôles. Aussi, l'agrégation de α -Syn corrélait avec Htt, Tau phosphorylée et TDP-43 chez les patients MH mais pas chez les contrôles. Les résultats de ces travaux fournissent des preuves que les protéinopathies Tau, α -Syn et TDP-43 sont augmentées

dans la MH et suggèrent également l'implication d'un mécanisme commun menant à l'accumulation aberrante de protéines sujettes à l'agrégation dans les maladies neurodégénératives.

Dans le cadre de ce projet de recherche, j'ai effectué les immunobuvardages ainsi que les dot blots pour la partie concernant la protéine Tau pour les fractions lyse, Sarkosyl et acide formique. J'ai aussi réalisé les PCR de l'épissage alternatif de l'exon 10 de Tau, soit Tau 3R et Tau 4R. J'ai contribué à l'écriture de la partie «Matériel et méthodes» et j'ai fait la quantification des résultats de Tau, l'analyse des résultats obtenus et la préparation des figures pour les résultats de cette protéine. Les résultats et les figures présentés ici sont donc tous tirés de cet article et ce chapitre présentera ainsi mes résultats obtenus pour la protéine Tau.

2. Introduction

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative autosomique dominante du cerveau humain causée par une mutation dans l'exon 1 du gène de la protéine huntingtine (Htt) (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Ross and Tabrizi, 2011). Cette mutation pathologique est présente lorsque la répétition du triplet CAG dans la région N-terminale de Htt est étendue à plus de 36 répétitions, avec une pénétrance complète de la maladie à un nombre de répétitions CAG (CAGn) supérieur à 40 (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Aronin et al., 1995).

Les patients atteints de la MH démontrent plusieurs symptômes incluant des déficits moteurs, comportementaux ainsi que cognitifs, et l'hétérogénéité clinique est commune pendant la maladie (Rosas et al., 2008; Waldvogel et al., 2012; Mehrabi et al., 2016). Cependant, le nombre de CAG à lui seul ne peut expliquer l'âge d'apparition des symptômes ou les scores cliniques, alors que les patients ayant une apparition tardive des symptômes tendent à présenter une progression accélérée de la maladie (Rosenblatt et al., 2012; Braisch et al., 2017). Le nombre de CAG et l'atrophie du cerveau expliquent ainsi seulement partiellement l'hétérogénéité des symptômes de la MH (Papoutsis et al., 2014; Jacobs et al., 2016). Il est alors probable que plusieurs facteurs biologiques sont impliqués dans l'évolution des symptômes de la MH et que le vieillissement pourrait avoir un impact sur les habiletés motrices et cognitives (Orth et al., 2010; Rosenblatt et al., 2012).

L'étude des lésions pathologiques dans la MH s'est concentrée principalement sur les anomalies en lien avec la protéine Htt à cause de l'étiologie connue de la maladie. Ces études utilisaient cependant un nombre limité d'échantillons et des techniques non quantitatives telles que l'immunohistochimie et l'immunofluorescence pour la caractérisation biochimique de Htt chez l'humain. Plusieurs cas décrivant une coexistence de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou la sclérose latérale amyotrophique ont été rapportés chez les patients atteints de la MH (Schwab et al., 2008; Tada et al., 2012; Davis et al., 2014). Ces résultats vont de paire avec de récentes études indiquant la présence de la protéine α -synucléine (α -Syn) et une pathologie Tau dans le cerveau d'individus atteints de

la MH (Charles et al., 2000; Tomas-Zapico et al., 2012; Fernandez-Nogales et al., 2014; Vuono et al., 2015; Gratuze et al., 2016; L'Episcopo et al., 2016). Des protéinopathies de la sorte ont aussi été observées dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et seraient associées avec une sous-classe de symptômes de la maladie (Larson et al., 2012; Josephs et al., 2015; Spires-Jones et al., 2017; Tremblay et al., 2017). Toutefois, une analyse biochimique complète des protéinopathies dites non Htt, comme la pathologie Tau, est toujours manquante.

Pour résoudre ce problème, nous avons étudié plusieurs protéines associées aux maladies neurodégénératives dont la protéine Tau dans une cohorte de 56 patients atteints de la MH et 31 individus contrôles. Nous avons quantifié les formes solubles et agrégées de la protéine Tau et nous avons observé une augmentation de l'agrégation et de la phosphorylation de Tau particulièrement dans les stades avancés de la MH. Ces résultats suggèrent ainsi que le vieillissement et/ou la neurodégénérescence joueraient un rôle dans les protéinopathies mixtes.

3. Matériel et méthodes

3.1 Échantillons humains

Tout d'abord, cette étude a été préalablement approuvée par le comité d'éthique du Centre de Recherche du CHU de Québec (#2017-3017). Les tissus congelés de putamens humains, pesant entre 0,5 g et 1,2 g par échantillon, ont été obtenus par le *Harvard Brain Tissue Resource Center* et par le *Human Brain and Spinal Fluid Resource Center* via la banque de cerveaux NIH Neurobiobank (tableau 3, tableaux supplémentaires 1 et 2). L'étude inclut des putamens provenant de 56 individus atteints de la maladie de Huntington (nommés ici HD pour *Huntington's disease*) et de 31 contrôles (CTL) qui ne sont pas atteints de la maladie de Huntington. À la suite de la réception des échantillons, les putamens post-mortem congelés ont été disséqués de la capsule interne et de la capsule externe. Ils ont ensuite été broyés par un biopulvérisateur avant d'être utilisés pour l'extraction afin d'analyser l'ARN et les protéines. La longueur des répétitions CAG a été déterminée par la Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes du CHU de Québec en utilisant une amorce fluorescente 6-FAM (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA) dans une amplification en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*, PCR) suivie par la détermination du produit de réaction en chaîne par polymérase (PCR) par électrophorèse capillaire dans un analyseur génétique 3130xl (Applied Biosystems Inc). Une étude a démontré que la sévérité de l'atrophie du striatum post-mortem chez les individus souffrant de la MH était corrélée avec le nombre de répétitions CAG au moment du décès (Penney et al., 1997). Le score de fardeau de la maladie (*disease burden score*) a été utilisé pour estimer l'exposition à la protéine huntingtine mutante chez les individus avec la MH, avant et après le début de l'apparition des symptômes (Tabrizi et al., 2009; Kloppel et al., 2015; Mason et al., 2015). Ce score a été déterminé en utilisant l'âge du décès et la plus longue séquence de répétition CAG avec l'équation suivante :

$$\text{Disease burden score} = \text{âge} \times (\text{nombre de CAG} - 35,5)$$

Tableau 3. Caractéristiques des individus des échantillons post-mortem

Diagnostic clinique	Grades de Vonsattel	Âge (gamme)	%F	Intervalle post-mortem (gamme)	N
Control	-	68.7 (35, 80)	32%	19.4 (8.1, 24.0)	31
HD	-	59.4 (40, 80)*	39%	20.4 (7.5, 32.9)	56
HD	HD2	65.4 (49, 80)	63%	21.6 (11.8, 27.1)	8
HD	HD3	59.3 (43, 75) [#]	27%	20.5 (7.5, 30.8)	33
HD	HD4	52.9 (40, 64) [#]	56%	20.4 (11.9, 32.9)	9

*P<0.001, test de Mann-Whitney; [#]P<0.01, tests de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn.

3.2 Extraction protéique (fractions soluble et acide formique)

Les protéines contenues dans les échantillons post-mortem de putamens ont été extraites selon des méthodes précédemment décrites, mais avec quelques modifications (Hernandez-Rapp et al., 2016; Tremblay et al., 2017). Ces échantillons ont été homogénéisés sur glace dans du tampon de lyse équivalent à 7 fois la quantité prélevée. Ce tampon de lyse est constitué de 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris, 0,5% de déoxycholate, 1% de Triton X-100, 0,5% de sodium dodécyl sulfate (SDS), un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Millipore Sigma, Etobicoke, ON, Canada) ainsi que 1 mM de fluorure de sodium et 1 mM d'orthovanadate de sodium activé agissant comme inhibiteurs de phosphatases. Les mélanges contenant le tampon de lyse et les échantillons ont subi une sonication à 3 reprises avec des séquences de 5 fois 1 seconde. La solution a alors été centrifugée à 100 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant (fraction soluble) a été retiré et entreposé à -80°C jusqu'à utilisation. Le culot a quant à lui été homogénéisé dans de l'acide formique (*formic acid*, FA) et centrifugé à 17 500 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant alors récolté a été divisé en aliquots et les protéines ont été séchées.

3.3 Extraction protéique (fraction Sarkosyl)

Environ 25 mg d'échantillons post-mortem ont d'abord été homogénéisés sur glace dans un volume de tampon RIPA équivalent à 7 fois la quantité d'échantillon prélevée. Le tampon

RIPA contient 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris, 0,5% de déoxycholate, 1% de Triton X-100, le cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete™ (Millipore Sigma) et d'inhibiteurs de phosphatases. Le mélange de tampon RIPA ajouté aux échantillons a été soniqué à 2 reprises pendant 5 fois 1 seconde, puis il a été centrifugé à 20 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant (fraction RIPA) a été récupéré et 1% de Sarkosyl (SRK) a été ajouté à 100 µL de la fraction RIPA. Cette solution a ensuite été incubée pendant 2h à 37°C, puis centrifugée à 100 000 g pendant 1h à 4°C selon une version modifiée de protocoles précédemment publiés (Greenberg and Davies, 1990; Julien et al., 2012; Tremblay et al., 2017). Le culot obtenu à la suite de cette centrifugation a été rincé avec 1% de SRK, resuspendu ensuite dans 50 µL de tampon d'échantillon NuPAGE LDS avec du dithiothréitol (DTT) et incubé pendant 10 minutes à 70°C, pour finalement être entreposé à -80°C jusqu'à utilisation (fraction SRK).

3.4 Immunobuvardage

La concentration en protéines de la fraction soluble a été déterminée en utilisant l'essai protéique Bradford (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Une quantité de 15 µg de protéines a été déposée dans les puits de gels de polyacrylamide eXtended Stain-Free 10% Tris-Glycine (Bio-Rad Laboratories). Les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE avec une migration d'approximativement 40 minutes à 0,1 ampère par gel et activées par transillumination UV comme décrit auparavant (Hernandez-Rapp et al., 2016) pour déterminer la quantité totale de protéines. Celles-ci ont été transférées dans un tampon de transfert Tris-glycine contenant 20% de méthanol pendant 1h à 100 volts sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories). Les membranes ont été bloquées dans une solution de 5% de lait et 1% d'albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin*, BSA) dissoute dans un tampon salin de Tris avec 0,1% de Tween 20 (*Tris buffered saline-Tween 20*, TBS-T). Les protéines ont été détectées en utilisant des anticorps primaires, des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris couplés à la peroxydase de raifort (*horseradish peroxydase*, HRP) ainsi qu'un substrat HRP chimiquement luminescent Immobilon Western (Millipore Sigma). Tous les anticorps utilisés sont indiqués dans le tableau 4. La spécificité pour les anticorps contre Tau a été

vérifiée à l'aide d'échantillons de cerveaux de souris TKO (Petry et al., 2014). Les bandes ont été visualisées avec le système d'imagerie Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) et l'intensité de ces bandes a été déterminée avec le logiciel ImageJ 1.45. Cette intensité a été normalisée sur la quantité totale de protéines par puits visualisées par rayons UV sur les membranes à la suite du transfert. Les protéines insolubles provenant de la fraction SRK ont subi la même électrophorèse et le même immunobuvardage que décrit précédemment.

Tableau 4. Anticorps utilisés dans cette étude.

Nom	Épitope/ immunogène	Clone	Espèce	Fournisseur	Dilution
TauC	acides aminés 243-441	Polyclonal	Lapin	Dako	10 000
AK-280	acétyl-Lys280	Polyclonal	Lapin	Anaspec	1 000
pS199	phospho-Ser199	Polyclonal	Lapin	Invitrogen	1 000
PHF1	phospho-Ser396/Ser404	PHF-1	Souris	Peter Davies	1 000
pT205	phospho-Thr205	Polyclonal	Lapin	Invitrogen	1 000
MC6	phospho-Ser235	MC6	Souris	Peter Davies	1 000

3.5 Dot blot

Pour la fraction FA, deux microlitres de chaque échantillon ont été déposés délicatement sur une membrane de nitrocellulose 0,45 μm (Bio-Rad Laboratories). Après que la membrane et les échantillons déposés à sa surface soient secs, les sites non spécifiques ont été bloqués avec une solution de 5% de lait et 1% de BSA dans un tampon phosphate contenant du Tween 20 (*phosphate buffered saline-Tween 20*, PBS-T). La membrane a ensuite subi le même procédé que décrit précédemment dans la section 1.4.4. Les points (dots) ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ et leur intensité a été normalisée sur la quantité totale de tissu utilisée pour l'extraction protéique.

3.6 Détermination de la variation d'épissage de l'exon 10 de la protéine Tau

Les expériences de PCR ont été effectuées en utilisant le Supermix PCR AccuStart™ II Geltrack™ (QuantaBio, Beverly, MA, USA) et les amorces suivantes ont été utilisées pour l'exon 10 de la protéine Tau humaine : 5'-CTCCAAAATCAGGGGATCGC-3' (exon 9F) et 5'-CCTTGCTCAGGTCAACTGGT-3' (exon 11R). Les conditions de PCR étaient les suivantes : 95°C pendant 5 minutes, 35 cycles à 95°C, 54°C puis 72°C pendant 30 secondes chacun, et finalement 72°C pendant 10 minutes pour l'élongation finale. Les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 2%, visualisés avec le marqueur d'acides nucléiques RedSafe™ (iNtRon Biotechnology, Lynnwood, WA, USA) et le système d'imagerie Fusion FX, puis quantifiés en utilisant le logiciel ImageJ 1.45.

3.7 Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Prism 7.0a (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Le seuil de significativité statistique a été établi à $P < 0,05$. L'évaluation de l'homogénéité des variances et la normalité ont été vérifiées pour toutes les données en utilisant le test Bartlett et les tests de normalité D'Agostino-Pearson ou Shapiro-Wilk, respectivement. Lorsque l'homogénéité des variances fut rejetée, la correction de Welch a été appliquée aux analyses. Dans le cas où une distribution gaussienne (loi normale) était confirmée, un t-test paramétrique (deux groupes) et une analyse de variance à un facteur (*one-way analysis of variance*, ANOVA) de plus de trois groupes ont été effectués. Des transformations logarithmiques ou de racine carrée ont été effectuées pour diminuer les variances et fournir des mesures distribuées de manière normale lorsque nécessaire. Sinon, des tests non paramétriques ont été utilisés, soit le test de Mann-Whitney pour deux groupes ou le test Kruskal-Wallis pour plus de trois groupes. Pour comparer plus de trois groupes, les tests de comparaison multiple de Tukey ou de Dunn ont été utilisés.

4. Résultats

4.1 L'hyperphosphorylation de Tau survient dans les stades avancés de la MH

Nous avons montré, avec d'autres études, une augmentation de la phosphorylation de Tau dans la MH (Blum et al., 2015; Gratuze et al., 2015; Vuono et al., 2015; L'Episcopo et al., 2016). Toutefois, la phosphorylation de Tau a été évaluée principalement dans des modèles animaux de cette maladie (Blum et al., 2015; Gratuze et al., 2015; L'Episcopo et al., 2016) ou bien dans des études portées sur les humains en utilisant des méthodes semi-quantitatives (Vuono et al., 2015) ou un petit nombre d'échantillons inférieur à 13 (Fernandez-Nogales et al., 2014). Nous avons donc analysé la protéinopathie Tau en détail dans notre cohorte d'individus atteints de la MH et d'individus contrôles. Nous avons observé une diminution des niveaux de protéine Tau soluble dans la MH à l'aide de l'anticorps TauC (0,74 fois, $P=0,0008$) comparativement aux contrôles (figure 13a, c).

Nous avons également étudié la phosphorylation de Tau en utilisant des anticorps spécifiques des phospho-épitopes dans la fraction protéique soluble. Une augmentation de la phosphorylation de Tau a été détectée au niveau des épitopes Ser396/Ser404 avec l'anticorps PHF1 (2,8 fois, $P=0,0002$), Ser199 avec l'anticorps pS199 (2,5 fois, $P<0,0001$) et Thr205 avec l'anticorps pT205 (1,6 fois, $P=0,0028$) dans la MH (figure 13b, d-j, k). Par contre, aucun changement n'a été détecté aux épitopes Ser235 avec l'anticorps MC6 (13f) et Ser262/Ser356 avec l'anticorps 12E8 (non illustré). Nous avons aussi analysé l'acétylation de l'épitope Lys280 de la protéine Tau avec l'anticorps AK-280, mais les données obtenues étaient plutôt similaires entre les groupes (figure 13j, l). Ces résultats sont cohérents avec ce qui avait été montré chez les modèles animaux (Blum et al., 2015; Gratuze et al., 2015) et confirment aussi l'hyperphosphorylation de Tau dans le putamen humain chez les individus atteints de la MH.

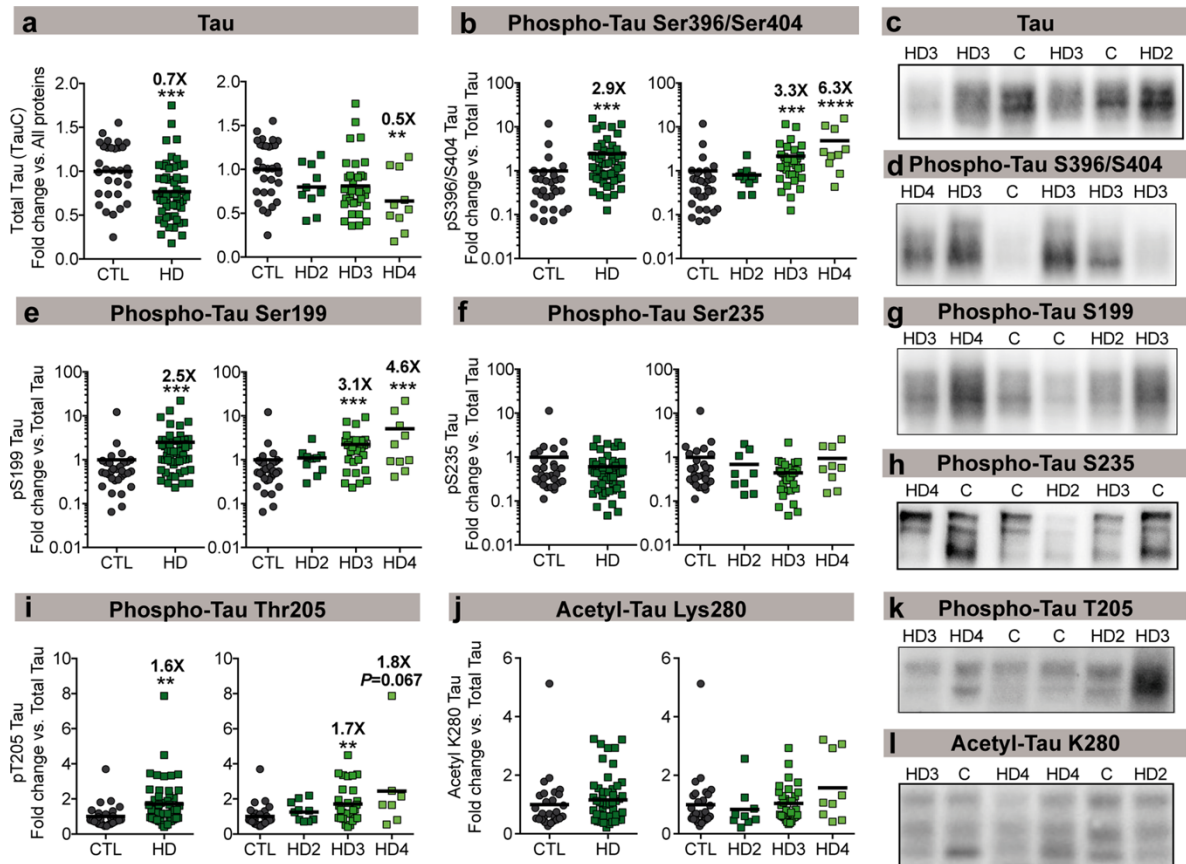


Figure 13. La phosphorylation de Tau augmente avec la progression de la maladie de Huntington (MH). (a) L'expression de la protéine Tau totale est réduite dans la MH tandis que la phosphorylation de la protéine Tau dans la fraction soluble est augmentée pour les épitopes (b) Ser396/Ser404 (anticorps PHF1), (e) Ser199 (anticorps pS199) et (i) Thr205 (anticorps pT205), mais pas pour (f) Ser235 (anticorps MC6) (Western blot). L'acétylation de Tau (anticorps AK-280) (j) n'est pas modifiée. Les valeurs individuelles sont illustrées et la moyenne est indiquée à l'aide d'un trait. Les niveaux de protéines phosphorylées et acétylées ont été normalisés sur la forme totale de Tau. (c-d, g-h, k-l) Immunoblots représentatifs des résultats obtenus pour les différents anticorps. Statistiques : Analyse de la covariance avec comme covariables le sexe et l'âge suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey. Les changements sont fournis pour chacun des groupes. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abréviations : C ou CTL, Contrôles; HD, Huntington's disease; HD2, grade 2 de Vonsattel; HD3, grade 3 de Vonsattel; HD4, grade 4 de Vonsattel. Tiré de (St-Amour et al., 2018).

Nous avons ensuite étudié l'oligomérisation de Tau dans la fraction Sarkosyl. Nous avons mesuré les monomères et les oligomères de manière indépendante et nous avons observé qu'il n'y avait aucune différence au niveau des oligomères de Tau, mais qu'il y avait une diminution significative au niveau des monomères (0,47 fois, $P=0,0011$) dans le grade 4 des patients atteints de la MH (figure 14a-c). Tous les phospho-épitopes testés se situaient sous le seuil de détection dans la fraction SRK, ce qui concorde avec les observations faites par Fernandez-Nogales *et al.* (non illustré) (Fernandez-Nogales et al., 2014). Nous avons cependant remarqué des niveaux de phosphorylation de Tau augmentés sur les phospho-épitopes Ser396/Ser404 (1,7 fois, $P=0,0003$), Ser199 (1,9 fois, $P=0,0002$) et Ser235 (1,2 fois, $P=0,002$) dans la fraction acide formique (FA) à l'aide de dot blots (figure 14d-k). Par contre, l'expression de la protéine Tau totale demeure inchangée. Donc, les formes solubles et agrégées de Tau sont toutes les deux phosphorylées dans la MH spécifiquement dans les stades avancés, soit les grades 3 et 4 chez les patients atteints de la MH.

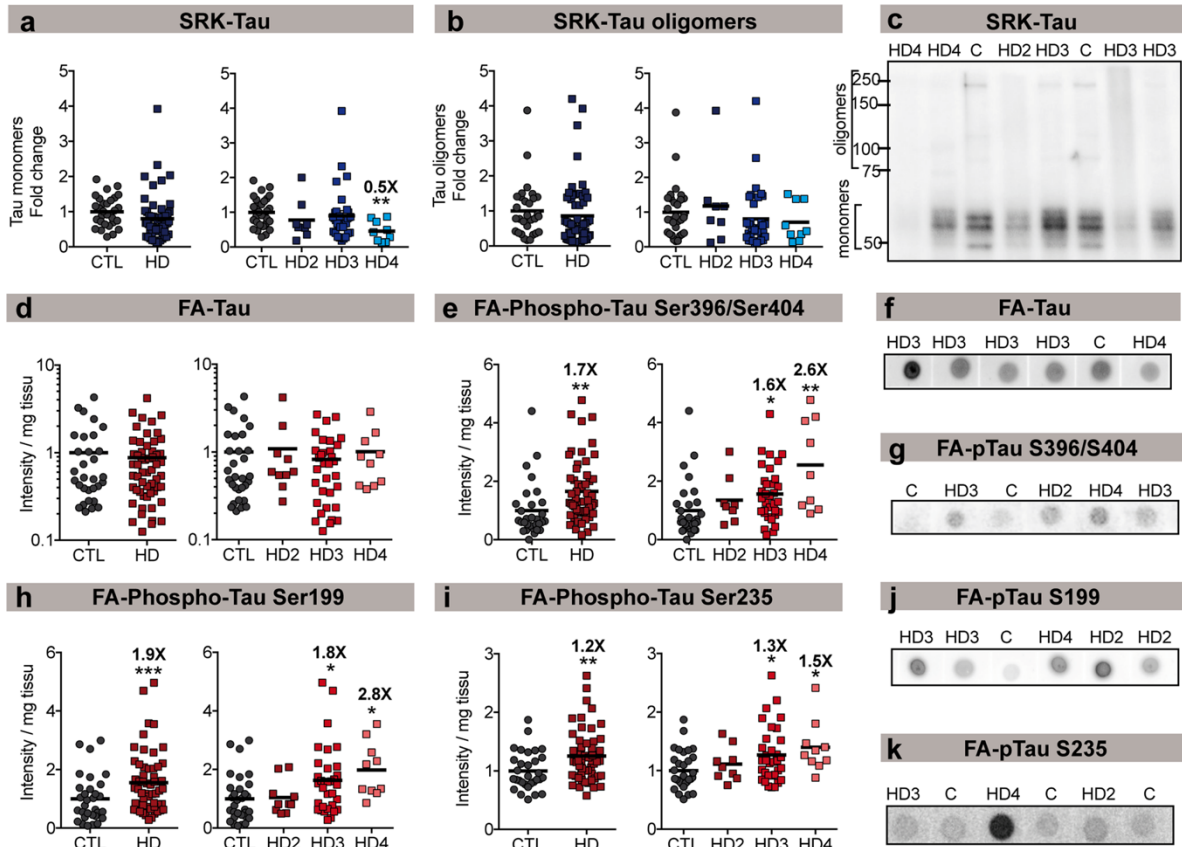


Figure 14. La phosphorylation de la protéine Tau insoluble augmente dans la MH. (a) Les monomères et **(b)** les oligomères de Tau ont été quantifiés dans la fraction SRK (Western blot). **(c)** Immunoblots représentatifs des résultats obtenus. Les poids moléculaires du marqueur Precision Plus Protein™ Standards sont indiqués et les régions d'intérêt analysées sont identifiées par des crochets. **(d-k)** Dans la fraction acide formique, **(d)** les niveaux de protéine Tau totale restent inchangés tandis que la phosphorylation aux épitopes **(e)** Ser396/Ser404 (anticorps PHF1), **(h)** Ser199 (anticorps pS199) et **(i)** Ser235 (anticorps MC6) est augmentée dans la MH (dot blots). **(f, g, j, k)** Les dot blots représentatifs pour chaque anticorps sont illustrés. Chaque point représente une donnée et la moyenne est indiquée par un trait. Statistiques : Analyse de la covariance avec **(a, b)** l'âge et le sexe ou **(d, e, h, i)** le sexe comme covariables suivie par un test de comparaison multiple de Tukey. Les changements significatifs sont fournis pour chacun des groupes. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; **** P<0,0001. Abréviations : C ou CTL, Contrôles; FA, fraction acide formique; HD, Huntington's disease; HD2, grade 2 de Vonsattel; HD3, grade 3 de Vonsattel; HD4, grade 4 de Vonsattel; pTau, Tau phosphorylée; SRK, fraction Sarkosyl. Tiré de (St-Amour et al., 2018).

4.2 Épissage alternatif aberrant de l'exon 10 de la protéine Tau dans la MH

L'exon 10 de la protéine Tau code pour un domaine de répétition de liaison aux microtubules. Son épissage alternatif influence le nombre de domaines de répétition exprimés (3R ou 4R) et peut ainsi influencer la liaison aux microtubules (Niblock and Gallo, 2012). Dans les maladies neurodégénératives comme la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence corticobasale, la maladie de Pick et la démence fronto-temporale, un mauvais épissage de la protéine Tau mène à un déséquilibre entre les isoformes 3R et 4R (Park et al., 2016). Une augmentation de l'isoforme 4R a d'ailleurs été rapportée dans la MH (Fernandez-Nogales et al., 2014; Vuono et al., 2015). Pour confirmer et renforcer ces données, nous avons procédé à l'évaluation de l'épissage alternatif de l'exon 10 dans notre cohorte, tant au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm. Tel que décrit dans la littérature, nous avons observé une augmentation de l'inclusion de l'exon 10 de la protéine Tau dans la MH démontrée par une augmentation des niveaux protéiques de Tau 4R (2,7 fois, $P=0,0005$). En effectuant le ratio des isoformes 4R/3R, nous avons obtenu une augmentation de ce ratio de 2,5 fois ($P=0,0014$) (figure 15a-c). De plus, nous avons aussi observé une augmentation de ce ratio 4R/3R au niveau de l'ARNm (1,8 fois, $P=0,001$) (figure 15d). Il est à noter que cette augmentation au niveau protéique de l'isoforme 4R de la protéine Tau n'est significative qu'aux grades 3 et 4 chez les patients atteints de la MH.

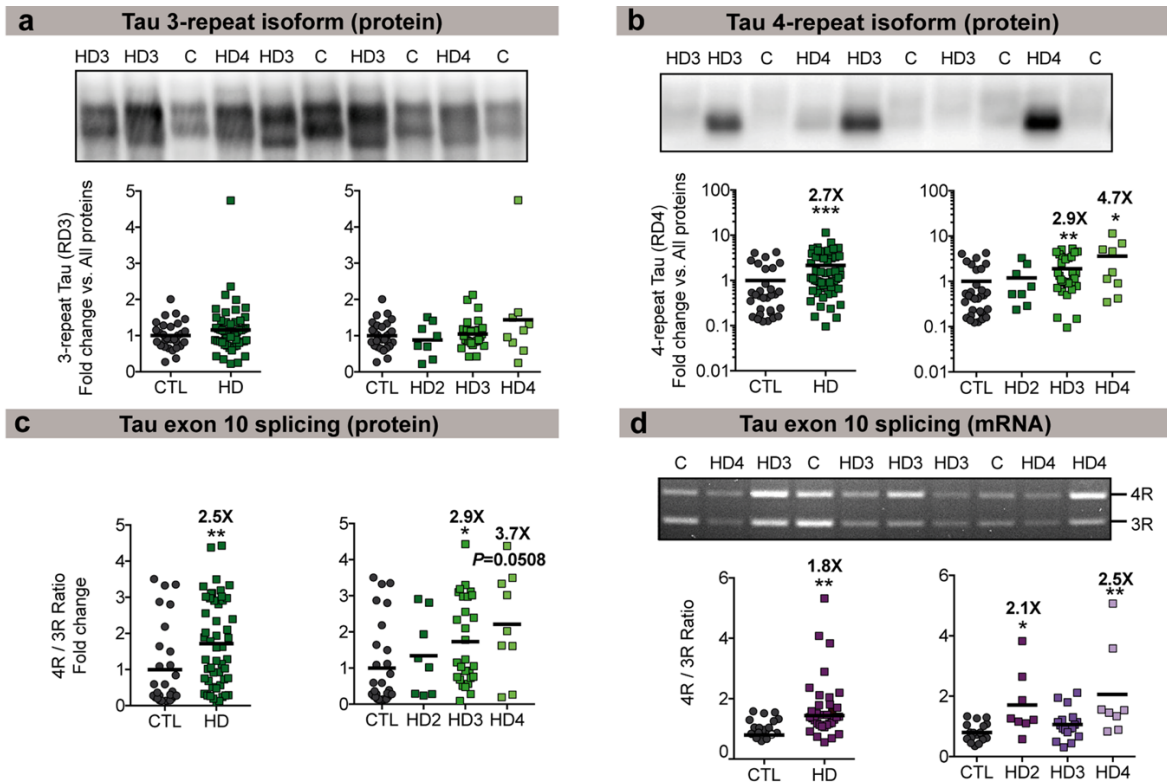


Figure 15. Défauts d'épissage alternatif de la protéine Tau dans la MH. Les isoformes de la protéine Tau avec 3 et 4 domaines de répétition (3R et 4R) ont été analysés (a-c) au niveau protéique (Western blot, N=29-31 CTL, 8 HD2, 28-33 HD3 et 9 HD4) et au niveau de l'ARNm (PCR, N=18 CTL, 8 HD2, 18 HD3, 8 HD4) Chaque point représente une valeur individuelle et la moyenne est indiquée par un trait. (a, b panneaux du haut) Des immunoblots et (d) une électrophorèse des produits de PCR représentatifs sont illustrés. Statistiques : Analyse de la covariance avec (a-c) l'âge et le sexe ou (d) le sexe comme covariables suivie par un test de comparaison multiple de Tukey. Les changements significatifs sont indiqués pour chacun des groupes. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; **** P<0,0001. Abréviations : C ou CTL, Contrôles; HD, Huntington's disease; HD2, grade 2 de Vonsattel; HD3, grade 3 de Vonsattel; HD4, grade 4 de Vonsattel. Tiré de (St-Amour et al., 2018).

5. Discussion

Dans cette étude, nous avons apporté des preuves biochimiques d'une pathologie Tau dans la MH, surtout en ce qui concerne les agrégats de protéines insolubles dans la fraction acide formique. À notre connaissance, il s'agit de la première étude approfondie à investiguer une panoplie de protéinopathies, particulièrement la protéine Tau, dans une cohorte de plus de 50 patients atteints de la MH. Effectivement, la littérature sur la pathologie Tau dans la MH fournit des résultats provenant de modèles animaux ou de petites cohortes contenant un petit nombre d'échantillons humains (Jellinger, 1998; Davis et al., 2014; Blum et al., 2015; Vuono et al., 2015; L'Episcopo et al., 2016). En somme, nos résultats montrent que la pathologie Tau est présente chez les individus atteints de la MH aux grades 3 et 4, mais plutôt absente au grade 2, ce qui suggère que cette pathologie Tau soit secondaire à la toxicité reliée à la protéine Htt ou à la neurodégénérescence.

Notre étude sur les diverses protéinopathies a été motivée par les récentes recherches montrant des signes indubitables d'une présence de pathologie Tau chez les individus atteints de la MH (Fernandez-Nogales et al., 2014; Vuono et al., 2015; L'Episcopo et al., 2016). L'hyperphosphorylation de Tau dans cette maladie a été décrite dans des modèles cellulaires et animaux ainsi qu'en marquage immunologique de cerveaux post-mortem (Blum et al., 2015; Vuono et al., 2015; L'Episcopo et al., 2016). Toutefois, cette hyperphosphorylation n'a jamais été réellement quantifiée chez les patients atteints de la MH sauf pour une étude de Fernandez-Nogales et ses collaborateurs, ces derniers n'ayant pas détecté d'augmentation d'immunoréactivité pour la phosphorylation de la protéine Tau au niveau de la Ser202/Thr205 ou de la Ser396/404 (Fernandez-Nogales et al., 2014). Ces résultats sont en contradiction avec nos données démontrant une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau sur différents épitopes tels la Ser396/Ser404, la Ser199 et la Thr205, mais ces différences pourraient s'expliquer par les différentes méthodes d'extraction protéique utilisées ou une augmentation de la puissance statistique en raison de la grandeur de notre cohorte. Nous n'avons pas observé une augmentation remarquable de la phosphorylation chez les patients atteints de la MH au grade 2. Ainsi, les grades de Vonsattel des quelques échantillons de striatum post-mortem utilisés dans l'étude menée

par Fernandez-Nogales pourraient expliquer aussi cette contradiction. Quelques mécanismes possibles de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans la MH ont été proposés, comme une augmentation de l'activité de GSK-3 β , la principale kinase de la protéine Tau, dans l'hippocampe humain et la dérégulation de la calcineurine (PP2B) dans les modèles animaux de cette maladie (Blum et al., 2015; Gratuze et al., 2015; L'Episcopo et al., 2016). En utilisant deux méthodes d'extraction différentes pour l'enrichissement en protéines agrégées, c'est-à-dire les extractions Sarkosyl (SRK)-insolubles et acide formique (FA), nous avons également confirmé les faibles, voire inexistantes, niveaux de phosphorylation de la protéine Tau dans la fraction SRK chez les patients atteints de la MH comme décrit précédemment par Fernandez-Nogales et ses collaborateurs (Fernandez-Nogales et al., 2014). Cependant, notre étude a révélé une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau insoluble dans la fraction acide formique (FA) chez les patients atteints de la MH aux grades 3 et 4. Cette incohérence entre les résultats obtenus entre les deux formes de Tau insoluble est insolite puisqu'une autre étude a récemment démontré des résultats homogènes pour l'analyse de la protéine Tau dans la fraction FA et la fraction SRK provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer en utilisant une méthode d'extraction très similaire, même si les comparaisons de groupes étaient statistiquement plus vigoureuses dans la fraction FA (Tremblay et al., 2017).

Dans cette étude, nous avons également montré des altérations de l'expression de la protéine Tau totale au niveau protéique, soit une perte modérée de Tau totale dans le putamen d'individus atteints de la MH. Des concentrations stables de protéine Tau et d'ARNm de Tau au niveau du striatum ont été montrées dans une étude de Fernandez-Nogales (Fernandez-Nogales et al., 2014). Leur taille d'échantillon plus petite pour la quantification de l'ARNm (N=5 pour les contrôles et N=9 pour les patients atteints de la MH) et des protéines (N=13 pour les contrôles et N=16 pour les patients atteints de la MH) ainsi que l'utilisation de différents contrôles pour la normalisation pourraient expliquer ces différences. Nous avons ensuite confirmé les défauts d'épissage alternatif qui sont illustrés par une augmentation du ratio 4R/3R des isoformes de la protéine Tau tels que décrits auparavant aux niveaux protéique et de l'ARNm (Fernandez-Nogales et al., 2014; Vuono et

al., 2015). Nous avons apporté une nouvelle dimension à cette observation en démontrant que les défauts d'épissage alternatif varient avec la progression de la maladie. Effectivement, une augmentation significative de l'isoforme de Tau 4R est observée dès le grade 2 pour l'ARNm ou le grade 3 au niveau protéique chez les patients atteints de la MH. La raison de cette variation demeure toutefois incertaine. Les défauts d'épissage dans la MH ont déjà été attribués aux altérations dans le facteur d'épissage 6 riche en sérine et en arginine (*serine/arginine-rich splicing factor-6*, SRSP6), qui favorise la production de l'isoforme de Tau 4R dans les lignées de cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y (Yin et al., 2012; Fernandez-Nogales et al., 2014). Associé à nos résultats, ceci suggère que la progression de la maladie reliée à la protéine Htt mutante pourrait être impliquée dans les changements provoqués par SRSP6 dans la MH. De plus, une augmentation de la protéine Tau 0N4R et une diminution des niveaux de Tau 1N3R dans tous les stades de la maladie ont été observés, ce qui suggère que les défauts d'épissage alternatif précèdent l'hyperphosphorylation de Tau dans la MH (St-Amour et al., 2018). Des altérations similaires de l'épissage alternatif ont aussi été rapportées dans la maladie d'Alzheimer avec, entre autres, une inclusion prédominante de l'exon 10 (Conrad et al., 2007)

L'hétérogénéité des symptômes retrouvés dans la MH ne peut être expliquée seulement qu'en partie par l'atrophie du cerveau ou le nombre de CAG, ce qui suggère une possibilité de mécanismes indépendants du nombre de CAG ou de la protéine Htt (Orth et al., 2010; Jacobs et al., 2016). Dans cette étude, nous amenons des preuves d'une accumulation anormale des protéines liées aux maladies neurodégénératives dans la fraction FA comme la protéine Tau. La pathologie Tau est plus fréquente dans les stades avancés de la maladie et la présence d'autres protéinopathies avec la pathologie Tau pourrait être impliquée dans la progression de la maladie. La présence de la pathologie Tau particulièrement aux stades avancés supporte l'idée que la pathologie reliée à la Htt serait à l'origine de multiples protéinopathies subséquentes. Nos résultats soulignent aussi une hétérogénéité qualitative et quantitative considérable entre chacun des cas observés. La méthodologie utilisée lors de cette étude ne permet cependant pas d'étudier les altérations morphologiques ou microscopiques dans les cerveaux atteints de la MH, ce qui rend impossible de déterminer

si les pathologies de protéines reliées aux maladies neurodégénératives, comme la protéine Tau, sont présentes dans les inclusions de Htt ou si elles représentent d'autres dépôts additionnels pathologiques. Des données quantitatives sur la charge des protéinopathies reliées aux maladies neurodégénératives provenant de grandes cohortes clinico-pathologiques sont nécessaires afin de clarifier l'influence relative de la protéine Tau sur le plan clinique de la MH. Quelques études post-mortem fournissent cependant des preuves donnant une responsabilité à ces protéines dans l'expression des symptômes. Par exemple, dans la MH, le polymorphisme de Tau a été relié à la progression des déficits cognitifs. Les porteurs de l'haplotype H2 de Tau ont montré une détérioration cognitive plus rapide comparativement aux homozygotes H1/H1 (Vuono et al., 2015). Ceci pourrait impliquer un rôle de la protéine Tau dans la symptomatologie de la MH, bien que son impact sur les stratégies d'un traitement pour la MH reste à déterminer.

En conclusion, nous avons montré que les différentes protéinopathies comme la pathologie Tau sont une caractéristique commune de la MH. Nos résultats soutiennent la preuve d'une augmentation de la sévérité et de la prévalence des protéinopathies avec la progression de la maladie. D'autres études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer le rôle de ces protéinopathies, comme la pathologie Tau, dans la neuropathologie, les symptômes et les stratégies thérapeutiques de la MH et pour clarifier les mécanismes impliqués.

5. Matériel supplémentaire

Tableau supplémentaire 1. Détails démographiques des individus contrôles

#Échantillon	Groupe	Âge au décès	Sexe	IPM (heures)	CAGn Allèle 1	CAGn Allèle 2	Protéino-pathies non Htt	Diagnostic clinique et commentaires des rapports de neuropathologie (lorsque disponible)
AN05548	C	63	F	24	21	24	-	
HSB4130	C	67	F	12	23		-	Maladie pulmonaire obstructive chronique. Cerveau normal.
HSB4431	C	68	F	24	20	21	-	Infection du myocarde. Athérosclérose minime. Cerveau normal.
AN08385	C	69	F	23	21	26	-	
AN08666	C	70	F	21	22	24	Tau, α -Syn	
HSB4660	C	73	F	19	19	21	-	Cancer pancréatique, diabète, hypertension artérielle. Cerveau normal.
AN00316	C	75	F	20	24	26	-	
AN03993	C	75	F	20	21		Tau	
AN07194	C	76	F	8	16	22	-	
AN017017	C	79	F	21	21	24	-	
HSB4823	C	35	M	12	19	23	Tau	Syndrome de Lennox Gastaut, épilepsie. Petite quantité de héméosidérine dans la matière blanche sous-corticale. Cerveau normal.
AN08288	C	57	M	22	22	24	Tau	
AN11864	C	57	M	22	22	25	-	
HSB5214	C	61	M	20	21	26	α -Syn	Aucune anomalie significative
HSB5222	C	61	M	22	20	26	-	Microinfarctus cortical aiguë, lobe frontal (accidentel).
AN13112	C	63	M	18	22	30	TDP-43	
AN13021	C	65	M	23	21	25	-	
AN13490	C	65	M	23	23	26	-	
HSB4514	C	66	M	17	19	21	α -Syn	Cancer des poumons. Maladie pulmonaire obstructive chronique. Cerveau normal.
AN18028	C	67	M	23	21	24	-	
HSB4494	C	67	M	12	21	22	-	Cancer de la prostate, démence, dépression. L'examen neuropathologique

								n'a montré aucune cause pour l'historique clinique de démence rapporté. Les dossiers cliniques ont indiqué que le début de démence serait induit par les drogues et/ou le cancer. Cerveau normal.
AN04193	C	68	M	18	20	21	-	
HSB5190	C	68	M	20	21	24	-	Crise cardiaque, hypertension artérielle. Le néocortex et l'hippocampe montrent un œdème.
HSB4308	C	70	M	12	24		-	Maladie de l'artère coronaire. Leucémie. Groupe de corps amyloïdes dans la matière blanche reflétant probablement le vieillissement. Cerveau normal.
AN06749	C	75	M	24	21	22	Tau	
AN10236	C	76	M	24	24	25	-	
AN06646	C	78	M	19	21	24	Tau	
HSB4039	C	78	M	18	22	27	-	Cancer de l'œsophage. Athérosclérose modérée. L'hippocampe montre des enchevêtrements neurofibrillaires occasionnels mais aucune dégénérescence granulovasculaire ou plaques neuritiques. Cerveau normal.
AN01009	C	79	M	22	25	28	-	
HSB4294	C	80	M	19	21	22	-	Cancer pancréatique. Cerveau normal.
HSB5265	C	80	M	19	22		-	Dégénérescence granulovasculaire et accumulation de lipofuscine dans les neurones hippocampiques compatible avec l'âge.

Tableau supplémentaire 2. Détails démographiques des individus atteints de la MH

#Échantillon	Grade de Vonsattel	Âge au décès	Sexe	IPM (heures)	CAGn	CAGn	<i>Disease burden score</i>	Protéino-pathies non Htt	Diagnostic clinique et commentaires des rapports de neuropathologie (lorsque disponible)
AN18077	HD4	40	F	12	20	49	534	Tau, α -Syn	
AN02001	HD4	48	F	19	30	49	671	Tau, α -Syn	
AN02322	HD3	49	F	27	22	49	659	α -Syn	
AN13564	HD3	53	F	18	21	46	559	α -Syn	
AN18185	HD3	55	F	23	21	48	687	-	
HSB5078		57	F	20	27	46	606	α -Syn	Pneumonie. Aucune plaque neuritique ou enchevêtrement neurofibrillaire dans le néocortex. Changements hypoxiques/ischémiques aigus dans l'hippocampe.
AN05441	HD3	57	F	21	26	48	709	Tau, α -Syn	
AN07129	HD4	58	F	33	19	57	1263	Tau, α -Syn	
HSB3159		59	F	15	21	46	622	-	
AN05137	HD3	59	F	16	21	48	733	-	
AN10758	HD3	59	F	20	24	47	686	-	
HSB3635		60	F	18	25	46	630	α -Syn	Pneumonie. Présence de quelques corps de Hirano dans l'hippocampe mais absence de dégénérescence granulovasculaire.
AN14943	HD4	60	F	22	25	47	690	α -Syn	
AN19120	HD2	64	F	12	25	44	560	-	
AN18888	HD4	64	F	24	22	47	710	-	
AN15447	HD2	65	F	24	14	47	748	-	
AN00678	HD3	65	F	23	23	44	569	Tau, TDP-43	
AN04921	HD3	66	F	17	28	44	576	-	
AN04283	HD2	68	F	15	22	46	718	-	
AN05099	HD3	70	F	24	25	43	551	Tau	
AN15792	HD2	75	F	27	26	43	558	n.d.	
AN17573	HD2	80	F	27	22	44	703	-	
AN11289	HD3	43	M	17	23	49	580	Tau	
AN13346	HD3	47	M	18	26	50	676	-	
AN07132	HD4	47	M	12	28	50	677	TDP-43	
AN03111	HD4	48	M	20	22	48	581	Tau	
AN03261	HD2	49	M	25	25	50	700	α -Syn	

AN09662	HD3	49	M	21	22	51	755	α -Syn	
HSB4518	HD3	49	M	13	28	49	656	α -Syn	Démence. Le néocortex et l'hippocampe sont normaux.
AN14786	HD3	50	M	23	24	47	573	Tau	
AN03194	HD3	52	M	16	25	48	631	-	
HSB4254	HD3	53	M	9	25	47	611	Tau	Dépression. Démence. Absence de plaques neuritiques ou d'enchevêtrements neurofibrillaires dans le néocortex. Aucun signe de neurodégénérescence ou d'hypoxie dans l'hippocampe.
AN05150	HD3	54	M	19	37	46	573	-	
HSB3744	HD1-2	55	M	19	21	47	635	α -Syn	Aucune preuve de plaques neuritiques ou d'enchevêtrements neurofibrillaires dans le cortex.
AN14532	HD3	55	M	25	23	50	789	Tau, α -Syn	
AN16254	HD4	55	M	22	21	63	1502	Tau, α -Syn, TDP-43	
AN00211	HD4	56	M	21	20	51	868	Tau	
AN12256	HD3	58	M	24	27	46	607	-	
AN07784	HD3	59	M	20	24	45	562	-	
AN19439	HD3	59	M	8	21	46	623	α -Syn	
AN19935	HD3	59	M	29	22	46	621	Tau	
AN00728	HD2	61	M	26	25	44	532	-	
HSB3730	HD2	61	M	17	21	45	588	α -Syn	Atrophie légère à modérée des lobes frontaux et temporaux. Les ventricules cérébraux latéraux sont modérément élargis. Aucune preuve de plaques neuritiques ou d'enchevêtrements neurofibrillaires.
AN11978	HD3	61	M	22	27	45	585	-	
AN05260	HD3	62	M	21	19	46	635	Tau, α -Syn	
AN17814	HD3	62	M	19	23	46	661	TDP-43	
AN16813	HD3	63	M	24	27	44	552	Tau	
AN10276	HD3	65	M	8	28	45	632	-	
HSB3048	HD3-4	66	M		22	44	572	-	
AN15322	HD3	67	M	31				-	

AN15997	HD3	67	M	31	24	45	646	-	
AN00780	HD3	71	M	19	22	46	754	Tau, TDP-43	
AN11740	HD3	71	M	26	25	45	690	α -Syn	
AN11020	HD3	73	M	23	30	49	1003	-	
HSB4013	HD2-3	75	M	18	26	43	592	α -Syn	Légère athérosclérose présente dans la vascularisation.
AN00325	HD3	75	M	23	27	44	658	Tau	

Chapitre 4 : Discussion et perspectives

Une interprétation et une discussion générale des résultats obtenus seront réalisées pour les chapitres 2 et 3 de ce mémoire. Ce quatrième et dernier chapitre permet un retour sur les résultats principaux montrés dans les chapitres précédents et permet d'identifier les limites des études réalisées dans le cadre de ma maîtrise. Des perspectives de recherche seront également abordées à la suite de l'obtention de ces résultats.

1. Retour sur les résultats et limites des études

1.1 Comparaison de différentes méthodes de préparation pour l'étude de la protéine

Tau par immunohistochimie

Le premier volet de ce mémoire avait comme objectif de comparer différentes méthodes de préparation et de fixation afin d'obtenir la meilleure combinaison pour étudier la protéine Tau, sous forme murine ou humaine, chez la souris par immunohistochimie et immunofluorescence. Pour ce faire, nous avons comparé deux fixateurs régulièrement utilisés en laboratoire pour l'étude de la protéine Tau, soit la solution de Bouin et le paraformaldéhyde 4%, deux méthodes de sacrifice, soit la perfusion intracardiaque et la décapitation, et la température du fixateur, soit 4°C et température pièce. Ces différentes conditions de préparation et de fixation ont été étudiées chez les modèles de souris WT, TKO, hTau et P301S. Les souris WT permettent d'évaluer les conditions de fixation en conditions normales physiologiques, tandis que les souris TKO servent de contrôles négatifs pour les différents marquages en raison de son absence de protéine Tau complète et fonctionnelle. Les souris hTau permettent de regarder la pathologie Tau au niveau de la protéine humaine sur un background *knock-out* de Tau murine, tandis que les souris P301S permettent l'étude de la protéine Tau humaine mutée surexprimée en présence de Tau murine, ce qui mène à l'agrégation de la protéine, la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires et ainsi à la pathologie Tau. En conditions physiologiques, la protéine Tau murine n'a pas la capacité de s'agréger et de former des enchevêtrements neurofibrillaires, causant ainsi la pathologie. Une mutation de la proline en sérine au niveau de l'acide aminé 301 cause ainsi un changement de structure et de conformation dans le domaine de liaison

aux microtubules, et ce changement des propriétés biochimiques de la protéine diminue sa capacité de liaison aux microtubules menant ainsi à l'agrégation de la protéine Tau (Hong et al., 1998; Yoshiyama et al., 2007). Ces quatre modèles murins utilisés ont permis d'analyser le marquage de Tau en conditions physiologiques et en contexte de Tauopathie. Le marquage obtenu dans cette étude est un marquage immunologique du neuropil, ce dernier étant une région dense constituée entre autres de synapses, d'axones non myélinisés et de dendrites.

Nos résultats présentent un meilleur marquage avec le Bouin comme fixateur comparativement au PFA 4%, autant en conditions physiologiques chez les souris WT qu'en contexte pathologique chez les souris hTau, ce qui suggère que le Bouin fixerait mieux la protéine Tau dans le cerveau de souris et préserverait une meilleure antigénicité des épitopes. Le Bouin permet aussi une meilleure résolution et préserve mieux les détails des différentes structures neuronales. Ces résultats pourraient être dus à la composition chimique des fixateurs testés. En effet, les fixateurs possèdent tous un coefficient et une cinétique de pénétration qui leur est propre, ce qui leur procure leur différence au niveau de leur utilisation pour la fixation de cellules ou tissus particuliers. Les fixateurs contenant de l'acide picrique, de l'acide acétique ou de l'acide tannique présentent un coefficient de diffusibilité plus élevé (Srinivasan et al., 2002), ce qui pourrait expliquer que le Bouin fixe mieux que le PFA 4%. Les tissus peu épais se fixent plus rapidement, puisque la profondeur pénétrée est dépendante du temps. En effet, le tissu fixé peut agir comme une barrière pour une fixation plus profonde par le fixateur, ce qui ralentit le taux de pénétration du fixateur dans le tissu. Le Bouin ayant une cinétique de pénétration efficace, le temps de fixation du tissu entier est plus court, ce qui permet d'avoir peu de dégradation cellulaire (Goding, 1996; Srinivasan et al., 2002). Le Bouin permet un meilleur marquage du neuropil et de la protéine Tau axonale, mais le PFA 4% permet une meilleure observation de la protéine Tau pathologique dans les modèles de souris transgéniques. Le marquage obtenu avec la fixation au PFA 4% est surtout situé dans le compartiment somatodendritique dans les neurones hippocampiques des souris hTau, et la protéine agrégée et pathologique est retrouvée à cet endroit. Par contre, la fixation au PFA 4% fixe plutôt mal la protéine Tau axonale et le neuropil, ce qui augmente ainsi le contraste entre la Tau physiologique et la

Tau pathologique. Le contraste est moins bien défini avec le Bouin, qui marque la protéine Tau physiologique et pathologique. L'utilisation du Bouin comme fixateur permet une meilleure observation de Tau particulièrement à 4°C dans ces modèles de souris, montrant que le marquage à 4°C est beaucoup plus net qu'à température pièce. Effectivement, l'utilisation d'un fixateur à 4°C permettrait d'inhiber l'activité enzymatique des kinases, des phosphatases et des protéases, ce qui résulterait en une meilleure observation de la phosphorylation et une diminution de la dégradation protéique pendant le processus de fixation. En ce qui concerne la méthode de sacrifice, le fait de perfuser ou non l'animal ne semble pas réellement influencer le marquage de la protéine Tau totale chez les souris WT, que ce soit par immunofluorescence ou par immunohistochimie. Par contre, tel que montré chez les souris P301S, la perfusion a un impact négatif sur l'observation de la phosphorylation de la protéine Tau pathologique, et le fait de ne pas perfuser procure un meilleur marquage immunologique pour étudier sa phosphorylation. La perfusion ne semble toutefois pas avoir d'impact sur l'observation de l'agrégation de la protéine Tau (à l'aide de l'anticorps MC1, reconnaissant un changement de conformation de la protéine au niveau du N-terminal et du troisième domaine de liaison aux microtubules) et sur l'observation de sa forme totale dans ce modèle de souris. La perte de phosphorylation lors de la perfusion pourrait être causée par la lenteur de la manœuvre. En effet, la perfusion intracardiaque prend plus de temps à effectuer et les tissus subissent une privation en sang et en oxygène, tandis que la décapitation permet une récupération plus rapide du cerveau. Le délai post-mortem plus élevé provoquerait ainsi une déphosphorylation accrue comparativement à la décapitation et résulterait en un marquage plus faible des phospho-épitopes affectés (Wang et al., 2015).

Notre étude a donc apporté des éléments importants concernant la méthode de fixation à choisir lors de l'étude de la protéine Tau. Tout d'abord, j'ai montré que le fixateur, la température de celui-ci et la méthode de sacrifice de l'animal ont tous des effets sur le marquage de Tau, tant au niveau de sa forme totale que de sa forme phosphorylée. J'ai aussi montré que la meilleure combinaison parmi toutes ces conditions pour l'observation optimale de la protéine Tau par immunohistochimie est la fixation avec le Bouin à 4°C et sans perfusion. Cette combinaison de méthodes pourrait être appliquée aux quatre différents

modèles de souris utilisés dans cette étude pour l'analyse de la protéine Tau tant en conditions physiologiques qu'en conditions pathologiques. Ceci permettrait d'obtenir des résultats fiables et représentatifs du cerveau murin dans le cadre d'étude en contexte de Tauopathie, comme la maladie d'Alzheimer où la pathologie Tau est particulièrement étudiée.

Limites de l'étude

Dans cette étude, nous avons utilisé différents modèles murins pour évaluer l'efficacité de différentes méthodes de fixation. Nous avons entre autres utilisé le modèle de souris B6, donc *wild-type*, qui contient la protéine Tau non mutée en conditions physiologiques chez la souris. Toutefois, la protéine Tau murine n'est pas exactement comme la protéine Tau humaine. D'abord, elle n'a pas la même séquence. La régulation de l'épissage de l'ARNm diffère entre les rongeurs et les humains, les rongeurs ayant seulement trois isoformes de Tau en comparaison avec six pour l'humain (Kosik et al., 1989b; Poorkaj et al., 2001). La protéine Tau murine ne contient que l'isoforme 4R et il y a aussi des différences au niveau des régions non codantes du gène *MAPT*. La protéine Tau en conditions physiologiques ainsi observée dans la souris pourrait alors être différente de celle observée en conditions physiologiques chez l'humain, et l'étude d'une éventuelle pathologie dans ce modèle pourrait ne pas être applicable à l'humain. De plus, la protéine Tau murine, pour une raison encore mal connue, n'a pas tendance à s'agréger et n'est donc pas ou peu pathologique. L'utilisation de modèles murins possédant la protéine Tau non mutée, comme les souris WT, n'est donc pas représentatif des conditions physiologiques ni pathologiques retrouvées chez l'humain.

Lors de la perfusion intracardiaque, la souris doit obligatoirement être anesthésiée, ce qui peut aussi biaiser les résultats. On sait que l'anesthésie induit l'hyperphosphorylation de la protéine Tau par l'intermédiaire de l'hypothermie (Planel et al., 2007). Une trop longue anesthésie avant de procéder à la chirurgie pourrait entraîner une hyperphosphorylation et la comparaison entre les deux méthodes de sacrifice serait alors erronée. Il est ainsi nécessaire de prendre la température rectale de chaque animal avant de procéder au

sacrifice pour s'assurer que les souris soient normothermiques. Lors de la décapitation, il faut aussi procéder rapidement pour réduire au minimum le stress de la souris. Le stress pourrait provoquer l'activation de molécules qui pourraient peut-être avoir un impact sur la protéine Tau. La récupération rapide du cerveau est également essentielle afin d'éviter une déphosphorylation post-mortem (Wang et al., 2015). En effet, la déphosphorylation dans le cerveau de souris est très rapide, et cela peut nuire à l'observation de certains épitopes phosphorylables de la protéine Tau tel que montré dans la figure 8 du chapitre 2. Le fait d'exécuter la manœuvre trop lentement peut alors influencer la phosphorylation dans le cerveau et ainsi altérer le marquage obtenu par immunohistochimie ou immunofluorescence.

Enfin, bien que cette étude fournisse des renseignements importants sur les conditions de fixation et de sacrifice à utiliser pour une observation optimale de la protéine Tau, les mécanismes par lesquels ces différentes conditions peuvent influencer le marquage de Tau restent à déterminer. L'utilisation du Bouin pour la fixation d'acides nucléiques (ARN et ADN) est toutefois controversée, mais elle semble bien fonctionner pour les protéines, particulièrement dans le cas de Tau. La différence avec le PFA 4% au niveau des mécanismes moléculaires de fixation reste à résoudre pour expliquer la différence entre les résultats obtenus.

1.2 Étude de la phosphorylation et de l'épissage alternatif de la protéine Tau dans la maladie de Huntington

Le deuxième volet de ce mémoire a pour but de confirmer notre hypothèse que la maladie de Huntington est une Tauopathie secondaire chez l'humain. L'objectif de ce projet visait à valider l'hyperphosphorylation ainsi que les défauts d'épissage alternatif de la protéine Tau dans la maladie de Huntington, mais cette fois-ci dans une cohorte de plus de 50 patients atteints de la MH. Pour ce faire, des échantillons post-mortem humains d'individus contrôles et d'individus atteints de la MH à différents stades ont été utilisés. Le putamen a été étudié puisqu'il s'agit d'une région particulièrement touchée dans la maladie. Une étude

précédente de Fernandez-Nogales et ses collaborateurs indique une pathologie Tau impliquée dans la MH chez l'humain mais seulement dans une petite cohorte de patients atteints de cette maladie (Fernandez-Nogales et al., 2014). L'utilisation de ces échantillons nous a donc permis d'analyser la protéine Tau chez l'humain dans un contexte de maladie de Huntington dans une cohorte de 56 patients. Nos résultats dévoilent une hyperphosphorylation importante aux grades 3 et 4 chez les patients atteints de la MH comparativement aux individus contrôles, ce qui suggère l'implication d'autres mécanismes découlant de la mutation sur la protéine huntingtine et menant à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans les stades tardifs de la maladie. En effet, une augmentation de la phosphorylation de Tau dans les formes solubles et insoluble (fraction FA) est observée pour ces grades, suggérant que l'hyperphosphorylation de Tau et la pathologie Tau subséquente est principalement due à la toxicité secondaire reliée à la mHtt ou à la neurodégénérescence causée par cette dernière. De plus, des défauts d'épissage alternatif menant à une augmentation du ratio des isoformes 4R/3R sont détectés chez les patients atteints de la MH aux grades 3 et 4 au niveau protéique et au grade 2 au niveau de l'ARNm. Une étude précédente a montré que l'augmentation de l'isoforme 4R dans le cerveau de patients atteints de la MH est accompagnée de dépôts de protéine Tau en forme de bâtonnets dans le noyau des neurones (Fernandez-Nogales et al., 2014). L'ensemble des résultats obtenus pourrait proposer une implication du débalancement entre les différents isoformes dans la progression de la maladie et la complication des symptômes par la formation d'agrégats. Des résultats similaires au niveau de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et de ses défauts d'épissage alternatif avaient été observés dans le striatum chez les patients atteints de la MH dans une petite cohorte (Fernandez-Nogales et al., 2014). Cependant, la puissance statistique de cette étude n'égale pas la nôtre en raison du nombre élevé d'individus dans notre cohorte, avec 56 patients atteints à différents stades de la maladie. Certaines études se sont penchées sur la clarification des mécanismes impliqués dans l'hyperphosphorylation dans des modèles murins de la MH, suggérant notamment une dérégulation de la calcineurine, aussi appelée PP2B, expliquant l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans ces modèles (Gratuze et al., 2015). Nous démontrons aussi une diminution de l'expression de la protéine Tau totale dans le putamen d'individus atteints de la MH au grade 4, tant dans la fraction lyse contenant les protéines solubles que dans la

fraction Sarkosyl contenant les protéines insolubles. Ces résultats pourraient potentiellement être subséquents à l'atrophie cérébrale de certaines régions du cerveau particulièrement touchées dans la maladie et à la perte neuronale qui en découle. Une augmentation de la dégradation de la protéine Tau par des mécanismes d'autophagie ou par le protéasome pourrait aussi être impliquée dans cette diminution. De plus, des mécanismes inconnus pourraient potentiellement provoquer une dérégulation au niveau de la transcription ou de la traduction, résultant en une quantité de protéines fonctionnelles plus faibles.

Notre étude a donc apporté de nombreux éléments importants aux différentes études qui existent déjà sur la protéine Tau dans un contexte de maladie de Huntington, particulièrement chez l'humain. D'abord, nous avons analysé une cohorte composée de 56 patients atteints de cette maladie, ce qui représente la plus grande cohorte humaine utilisée pour étudier la pathologie Tau dans la MH. Ensuite, j'ai apporté une confirmation de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans les stades avancés de la maladie, soit les grades 3 et 4 de Vonsattel. Enfin, j'ai aussi démontré un défaut de l'épissage alternatif dans la MH, menant à l'augmentation de l'isoforme 4R et du ratio 4R/3R chez l'humain, ce qui concorde avec les observations faites dans de plus petites cohortes avec une puissance statistique plus faible (Fernandez-Nogales et al., 2014; Vuono et al., 2015). Ces résultats suggèrent que la protéine Tau pourrait contribuer aux dysfonctions cognitives dans la MH.

Limites de l'étude

L'utilisation d'échantillons post-mortem engendre cependant des résultats très variables. En effet, la variabilité est très grande d'un humain à l'autre et ainsi d'un échantillon à l'autre. Lors des révélations de nos membranes par Western blot, certains échantillons d'un même groupe ne présentaient aucune bande à la suite de l'hybridation avec un même anticorps primaire et secondaire, tandis que certains présentaient des bandes très foncées. Cette grande variabilité mène ainsi à des écart-types énormes lors de la quantification des résultats et il peut être alors difficile de les interpréter. De plus, puisqu'il s'agit d'humains, l'intervalle post-mortem avant la récupération des tissus est plus long que les modèles

animaux. Vu le contexte, un délai post-mortem inférieur à 24 heures est habituellement jugé acceptable. Les délais post-mortem des échantillons utilisés dans cette étude varient entre environ 7 heures à plus de 32 heures, ce qui peut créer une différence au niveau de la dégradation protéique et de la déphosphorylation pendant toutes ces heures. Effectivement, au moment du décès, les kinases ne sont plus alimentées en ATP et arrêtent leur activité de phosphorylation, contrairement aux phosphatases qui fonctionnent plus efficacement que les kinases dans ces conditions, comme PP2A (Li et al., 2003; Wang et al., 2015). Il aurait été intéressant de réaliser une corrélation entre les délais post-mortem et les niveaux de Tau totale et phosphorylée. Aussi, lors de l'extraction protéique pour former la fraction Sarkosyl, le protocole indique de chauffer à 37°C pendant 2h à la suite de l'ajout du Sarkosyl, ce qui peut entraîner une dégradation et une déphosphorylation des protéines. Avec cette fraction, il est alors impossible, ou du moins non représentatif, d'étudier la phosphorylation de la protéine Tau en raison de la dénaturation et la déphosphorylation.

Les résultats de notre étude amènent donc des réponses quant à la présence de la pathologie Tau dans la MH. Cependant, plusieurs questions restent sans réponses. Par quels mécanismes l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans la MH se produit-elle ? Comment une mutation sur la protéine Htt peut engendrer une hyperphosphorylation de Tau et provoquer un dysfonctionnement de l'épissage alternatif de cette protéine ? Un résumé des possibles mécanismes par lesquels la pathologie Tau pourrait être induite est suggéré par Gratuze et ses collaborateurs (figure 16) (Gratuze et al., 2016). Toutefois, une clarification du mécanisme et de l'impact de la mHtt sur la pathologie Tau et les autres protéinopathies demeure nécessaire pour la compréhension de la pathologie.

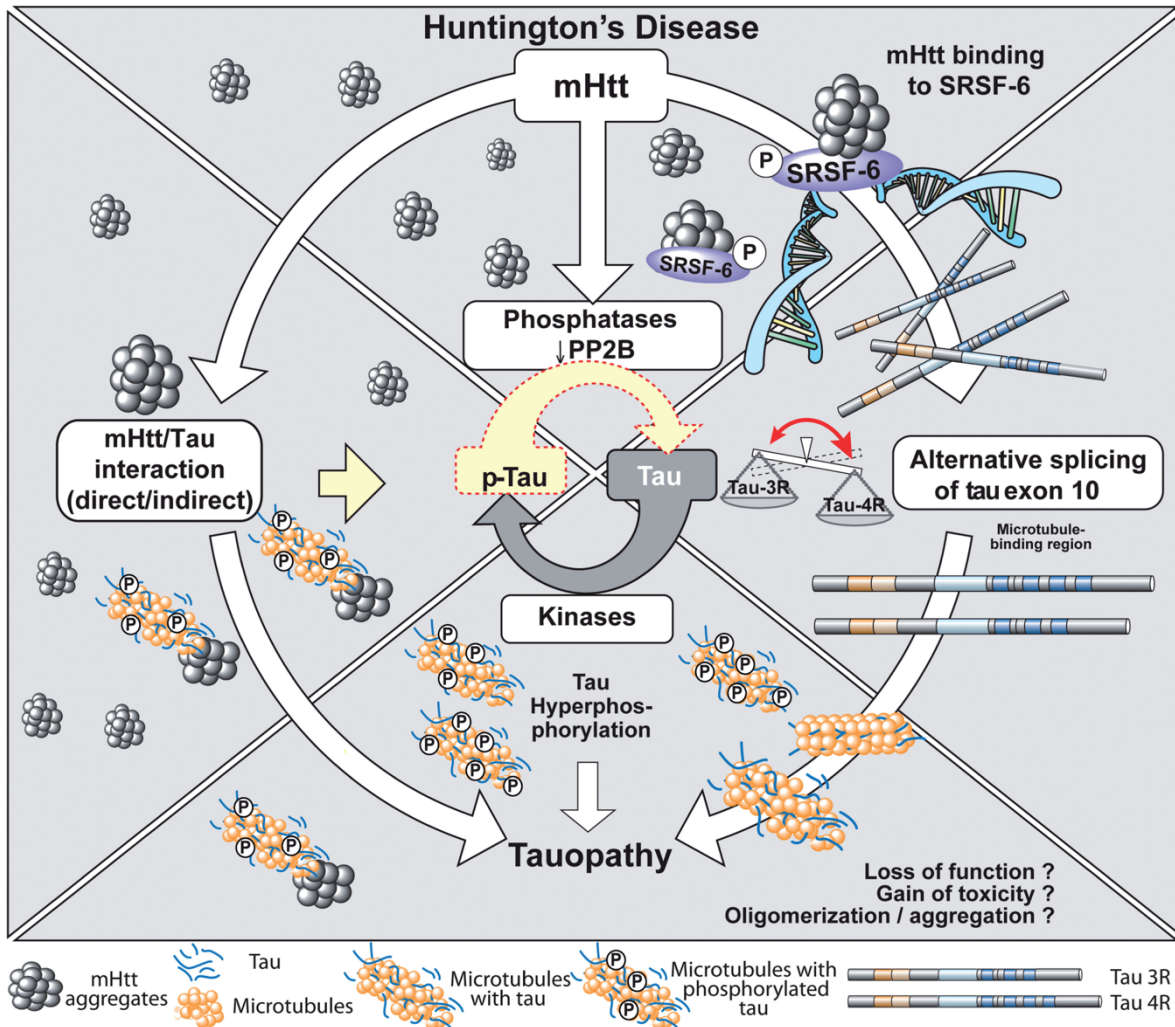


Figure 16. Représentation schématique des voies de signalisation par lesquelles la mHtt induirait une pathologie Tau dans la maladie de Huntington. Récapitulation sous forme de schéma des possibles mécanismes engendrant la pathologie Tau dans la maladie de Huntington selon les données et les résultats obtenus chez l'humain, les modèles animaux et les modèles cellulaires. La mHtt peut interférer avec plusieurs fonctions cellulaires et ainsi avoir un impact sur le rôle de diverses protéines. Son interaction avec le facteur d'épissage de Tau SRSF6 causerait un déséquilibre entre les différents isoformes de Tau, soit une augmentation de l'isoforme 4R par rapport à l'isoforme 3R. En présence de mHtt, une diminution significative des niveaux de PP2B (calcineurine) est détectée dans les cellules, ce qui promouvoirait l'hyperphosphorylation de Tau. Des interactions directes ou indirectes (par un partenaire de liaison commun comme les microtubules) de mHtt avec Tau pourraient aussi provoquer la phosphorylation de la protéine Tau. Ces différents mécanismes pourraient possiblement agir ensemble afin d'induire la pathologie Tau dans la maladie de Huntington. Tiré de (Gratuze et al., 2016).

2. Perspectives

Plusieurs perspectives peuvent naître à la suite des résultats obtenus dans ce mémoire. Tout d'abord, notre étude sur les méthodes de préparation a démontré que la fixation avec le Bouin à 4°C et sans perfusion résulterait en un meilleur marquage de la protéine Tau chez la souris par immunohistochimie. Nous pourrions également comparer différentes méthodes de fixation avec différents fixateurs, toujours pour l'étude de Tau par immunohistochimie, par exemple en comparant le glutaraldéhyde et le méthanol qui sont deux fixateurs communément utilisés en laboratoire. Dans ce cas, il faudrait aussi comparer nos mêmes conditions, soit la méthode de sacrifice et la température du fixateur, pour vérifier les résultats de la combinaison de ces méthodes avec le nouveau fixateur étudié. Il serait aussi intéressant de vérifier si le Bouin est le meilleur fixateur pour le marquage d'autres protéines, comme la protéine Htt ou d'autres protéines impliquées dans différentes maladies neurodégénératives. Les protéines varient grandement au niveau de leur pH, leur point isoélectrique et leur solubilité, alors peut-être qu'une fixation au Bouin pourrait être convenable pour l'étude de la protéine Tau, mais pas pour l'étude d'autres protéines neuronales. De plus, une étude sur la comparaison de différentes méthodes de préparation et de fixation sur des tissus humains pourrait être une avenue. L'immunoréactivité diffère entre les différentes espèces et il serait intéressant d'analyser les différentes méthodes et conditions de fixation entre elles et aussi entre deux espèces. L'étude entre l'humain et la souris pourrait s'avérer fort utile, puisqu'il s'agit des deux modèles les plus utilisés pour l'étude de la protéine Tau dans un contexte pathologique de maladies neurodégénératives. Un meilleur marquage de la protéine Tau permettrait ainsi d'obtenir des résultats plus rigoureux pour l'observation de Tau et de sa phosphorylation par des méthodes non quantitatives et ainsi arriver à des conclusions exactes.

En ce qui trait à la pathologie Tau dans la maladie de Huntington, une étude approfondie des différents mécanismes menant à l'hyperphosphorylation de Tau et à une déficience de son épissage alternatif est requise afin d'améliorer la compréhension de cette Tauopathie secondaire. La régulation de la phosphorylation physiologique de la protéine Tau est faite par l'action de plusieurs kinases et phosphatases. Parmi les kinases de Tau, GSK-3 β , la

kinase cycline-dépendante 5 (*cyclin-dependent kinase 5*, CDK5), les kinases régulées par signal extracellulaire 1 et 2 (*extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*, ERK1 et ERK2) et CaMKII sont sous-régulées dans plusieurs modèles murins de la MH (Deckel et al., 2002; Luo et al., 2005; Lim et al., 2014; Fernandez-Nogales et al., 2015; Gratuze et al., 2015). Ces kinases ne seraient donc pas impliquées dans l'hyperphosphorylation de Tau, mais l'activité d'autres kinases pourrait quant à elle se trouver augmentée. Une dérégulation négative de certaines phosphatases, soit PP1, PP2A et PP2B, a été observée dans le modèle de souris R6/2, qui est un modèle murin de la MH (Gratuze et al., 2015; Blum et al., 2015). De manière particulière, une diminution de l'expression de la calcineurine tant au niveau protéique que ARNm a été observée autant chez les modèles murins que chez les patients, et ces observations seraient attribuables à la déficience de l'homéostasie du calcium dans la MH (Goto et al., 1989; Luthi-Carter et al., 2000; Lievens et al., 2002; Hodges et al., 2006; Lim et al., 2008; Xifro et al., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère que la mHtt pourrait induire une diminution de PP2B, ce qui pourrait provoquer l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau. L'étude de l'activité des différentes kinases dont l'activité pourrait être augmentée et des phosphatases de Tau dans des échantillons post-mortem provenant d'individus atteints de la MH pourrait améliorer notre compréhension du phénomène.

Il serait également intéressant d'évaluer le rôle de la protéine Tau sur les déficits cognitifs reliés à la MH dans des modèles de souris de la maladie avec l'expression de la protéine Tau humaine ou avec un *knock-out* de Tau. Une étude a d'ailleurs montré que les souris R6/1 présentant un *knock-out* pour la protéine Tau manifestent une déficience motrice modérée en comparaison avec les souris de ce modèle qui possédaient la protéine Tau (Fernandez-Nogales et al., 2014). La protéine Tau pourrait aussi avoir des effets au niveau des habiletés motrices, et il serait pertinent d'observer l'effet de la protéine Tau humaine ou de la délétion de Tau sur les fonctions motrices dans les modèles murins de la MH. Les mécanismes menant à un possible impact de la pathologie Tau sur les fonctions motrices devront également être élucidés, vu son rôle ambigu.

Conclusion

La pathologie Tau est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington. Des recherches constantes sont effectuées afin de clarifier les causes exactes de ces maladies et de trouver éventuellement un traitement pour guérir les patients qui en sont atteints. L'étude de la protéine Tau dans ces maladies neurodégénératives est donc de la plus grande importance en raison de son implication ainsi que des conséquences potentielles de son hyperphosphorylation et de son agrégation.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont permis de démontrer que le choix de la méthode de préparation et du fixateur est crucial pour l'observation optimale de la protéine Tau, que ce soit sous sa forme phosphorylée ou totale, par immunohistochimie dans différents modèles murins. Ces travaux ont aussi démontré que la pathologie Tau est bel et bien une Tauopathie secondaire dans la maladie de Huntington chez l'humain, apparaissant dans les stades avancés de la maladie.

L'utilisation de la meilleure méthode de sacrifice, du meilleur fixateur et de la meilleure température de ce dernier permet l'obtention d'un meilleur marquage et de meilleures microphotographies à la suite d'immunohistochimie, ce qui est nécessaire pour l'étude de la protéine Tau dans divers contextes pathologiques. Un marquage optimal permet d'obtenir des résultats clairs et les conclusions découlant de l'interprétation de ces résultats sont ainsi exactes. Ce travail pose donc des bases de rigueur et de méthodologie contribuant à éviter certains biais dans les prochaines études. De plus, la confirmation que la pathologie Tau est effectivement une Tauopathie secondaire dans les stades avancés d'une cohorte de 56 individus atteints de la MH permet ainsi d'ajouter une compréhension de son rôle dans cette maladie. Une clarification des mécanismes moléculaires menant à l'hyperphosphorylation et ultimement à la pathologie Tau dans la MH est nécessaire afin de bien comprendre la progression de la maladie à la suite d'une mutation de la protéine Htt. Ce mémoire présente ainsi une meilleure caractérisation biochimique et immunohistochimique de Tau dans différentes pathologies, ce qui sera utile pour les études futures de la protéine Tau.

Bibliographie

- Ahmed, T., et al., 2014. Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol Aging*. 35, 2474-2478.
- Alzheimer, A., et al., 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*. 8, 429-31.
- Andreadis, A., 2006. Misregulation of tau alternative splicing in neurodegeneration and dementia. *Prog Mol Subcell Biol*. 44, 89-107.
- Arendt, T., Stieler, J.T., Holzer, M., 2016. Tau and tauopathies. *Brain Res Bull*. 126, 238-292.
- Arevalo-Rodriguez, I., et al., 2015. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of Alzheimer's disease and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev*. CD010783.
- Arnold, S.E., et al., 1991. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*. 1, 103-16.
- Aronin, N., et al., 1995. CAG expansion affects the expression of mutant Huntingtin in the Huntington's disease brain. *Neuron*. 15, 1193-201.
- Aronov, S., et al., 2001. Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci*. 21, 6577-87.
- Arrasate, M., Perez, M., Avila, J., 2000. Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res*. 25, 43-50.
- Arriagada, P.V., et al., 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 42, 631-9.
- Avila, J., et al., 2002. Tau function and dysfunction in neurons: its role in neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*. 25, 213-31.
- Avila, J., et al., 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*. 84, 361-84.
- Baker, A.F., et al., 2005. Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. *Clin Cancer Res*. 11, 4338-40.
- Bancher, C., et al., 1996. On the relationship between measles virus and Alzheimer neurofibrillary tangles in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurobiol Aging*. 17, 527-33.
- Bates, G.P., et al., 2015. Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers*. 1, 15005.
- Berchtold, N.C., Cotman, C.W., 1998. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging*. 19, 173-89.
- Berod, A., Hartman, B.K., Pujol, J.F., 1981. Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J Histochem Cytochem*. 29, 844-50.
- Biernat, J., et al., 2002. Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell*. 13, 4013-28.
- Blum, D., et al., 2015. Mutant huntingtin alters Tau phosphorylation and subcellular distribution. *Hum Mol Genet*. 24, 76-85.

- Boutajangout, A., et al., 2004. Expression of tau mRNA and soluble tau isoforms in affected and non-affected brain areas in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 576, 183-9.
- Braak, H., Braak, E., 1985. On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 68, 325-32.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-59.
- Braak, H., et al., 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 112, 389-404.
- Bracco, L., et al., 1994. Factors affecting course and survival in Alzheimer's disease. A 9-year longitudinal study. *Arch Neurol.* 51, 1213-9.
- Braisch, U., et al., 2017. Identification of extreme motor phenotypes in Huntington's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 174, 283-294.
- Brands, A.M., et al., 2005. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 28, 726-35.
- Brandt, R., Leger, J., Lee, G., 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol.* 131, 1327-40.
- Brion, J.P., et al., 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol.* 17, 89-96.
- Brion, J.P., et al., 1991a. Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles. N- and C-terminal regions are differentially associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site. *Biochem J.* 273(Pt 1), 127-33.
- Brion, J.P., et al., 1991b. A68 proteins in Alzheimer's disease are composed of several tau isoforms in a phosphorylated state which affects their electrophoretic mobilities. *Biochem J.* 279 (Pt 3), 831-6.
- Burns, J.A., et al., 2009. Choice of fixative is crucial to successful immunohistochemical detection of phosphoproteins in paraffin-embedded tumor tissues. *J Histochem Cytochem.* 57, 257-64.
- Caceres, A., Kosik, K.S., 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature.* 343, 461-3.
- Caffrey, T.M., Wade-Martins, R., 2012. The role of MAPT sequence variation in mechanisms of disease susceptibility. *Biochem Soc Trans.* 40, 687-92.
- Caparros-Lefebvre, D., et al., 2009. Association of corticobasal degeneration and Huntington's disease: can Tau aggregates protect Huntingtin toxicity? *Mov Disord.* 24, 1089-90.
- Charles, V., et al., 2000. Alpha-synuclein immunoreactivity of huntingtin polyglutamine aggregates in striatum and cortex of Huntington's disease patients and transgenic mouse models. *Neurosci Lett.* 289, 29-32.
- Chasseigneaux, S., Allinquant, B., 2012. Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J Neurochem.* 120 Suppl 1, 99-108.
- Chen, J., et al., 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature.* 360, 674-7.
- Chen, S., et al., 2008. I1PP2A affects tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 283, 10513-21.
- Chetelat, G., et al., 2010. Relationship between atrophy and beta-amyloid deposition in Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 67, 317-24.

- Chin, S.S., Goldman, J.E., 1996. Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55, 499-508.
- Cisbani, G., Cicchetti, F., 2012. An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. *Cell Death Dis.* 3, e382.
- Cisbani, G., et al., 2017. Presence of tau pathology within foetal neural allografts in patients with Huntington's and Parkinson's disease. *Brain.* 140, 2982-2992.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1977. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 116, 207-25.
- Cohen, T.J., et al., 2013. The microtubule-associated tau protein has intrinsic acetyltransferase activity. *Nat Struct Mol Biol.* 20, 756-62.
- Collot, M., Louvard, D., Singer, S.J., 1984. Lysosomes are associated with microtubules and not with intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 788-92.
- Conrad, C., et al., 2007. Single molecule profiling of tau gene expression in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 103, 1228-36.
- Consolazione, A., et al., 1981. Immunocytochemical detection of serotonin with monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem.* 29, 1425-30.
- Constantinescu, R., et al., 2011. Increased levels of total tau protein in the cerebrospinal fluid in Huntington's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 17, 714-5.
- Cook, C., et al., 2014. Acetylation of the KXGS motifs in tau is a critical determinant in modulation of tau aggregation and clearance. *Hum Mol Genet.* 23, 104-16.
- Cowan, C.M., Raymond, L.A., 2006. Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Curr Top Dev Biol.* 75, 25-71.
- Craufurd, D., et al., 2015. Diagnostic genetic testing for Huntington's disease. *Pract Neurol.* 15, 80-4.
- Culling, C., Reid, P., Sinnott, N., 1980. The effect of various fixatives and trypsin digestion upon staining of routine paraffin-embedded sections by the peroxidase-anti-peroxidase and immunofluorescent technique. *Journal of Histotechnology.* 3-10.
- Dapson, R.W., 2007. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotech Histochem.* 82, 133-40.
- Davis, M.Y., et al., 2014. The co-occurrence of Alzheimer's disease and Huntington's disease: a neuropathological study of 15 elderly Huntington's disease subjects. *J Huntingtons Dis.* 3, 209-17.
- Dawson, H.N., et al., 2001. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci.* 114, 1179-87.
- Deckel, A.W., Elder, R., Fuhrer, G., 2002. Biphasic developmental changes in Ca²⁺/calmodulin-dependent proteins in R6/2 Huntington's disease mice. *Neuroreport.* 13, 707-11.
- Delacourte, A., Defossez, A., 1986. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci.* 76, 173-86.
- Delacourte, A., et al., 1990. Pathological proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. Demonstration with a panel of antibodies against Tau proteins. *Acta Neuropathol.* 80, 111-7.

- Delacourte, A., et al., 1998. Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol.* 43, 193-204.
- Delacourte, A., et al., 1999. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology.* 52, 1158-65.
- Delaere, P., et al., 1991. Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol.* 81, 328-35.
- Dickey, C.A., et al., 2007. The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J Clin Invest.* 117, 648-58.
- Dickson, D.W., et al., 2011. Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau). *J Mol Neurosci.* 45, 384-9.
- Dixit, R., et al., 2008. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science.* 319, 1086-9.
- Dominguez, D.J., et al., 2013. Multi-modal neuroimaging in premanifest and early Huntington's disease: 18 month longitudinal data from the IMAGE-HD study. *PLoS One.* 8, e74131.
- Dotti, C.G., Banker, G.A., Binder, L.I., 1987. The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience.* 23, 121-30.
- Drubin, D.G., Caput, D., Kirschner, M.W., 1984. Studies on the expression of the microtubule-associated protein, tau, during mouse brain development, with newly isolated complementary DNA probes. *J Cell Biol.* 98, 1090-7.
- Eltoum, I., Fredenburgh, J., Grizzle, W.E., 2001. Advanced Concepts in Fixation: 1. Effects of Fixation on Immunohistochemistry, Reversibility of Fixation and Recovery of Proteins, Nucleic Acids, and other Molecules from Fixed and Processed Tissues. 2. Developmental Methods of Fixation. *Journal of Histotechnology.* 24, 201-210.
- Fath, T., Eidenmuller, J., Brandt, R., 2002. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 22, 9733-41.
- Feinstein, S.C., Wilson, L., 2005. Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1739, 268-79.
- Fernandez-Nogales, M., et al., 2014. Huntington's disease is a four-repeat tauopathy with tau nuclear rods. *Nat Med.* 20, 881-5.
- Fernandez-Nogales, M., et al., 2015. Decreased glycogen synthase kinase-3 levels and activity contribute to Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 24, 5040-52.
- Flament, S., et al., 1990. Correlation between microscopical changes and Tau 64 and 69 biochemical detection in senile dementia of the Alzheimer type. Tau 64 and 69 are reliable markers of the neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol.* 80, 212-5.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R., 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 12, 189-98.
- Forstl, H., Kurz, A., 1999. Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 249, 288-90.
- Fox, C.H., et al., 1985. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* 33, 845-53.

- Frappier, T.F., et al., 1994. tau Regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling. *J Neurochem.* 63, 2288-94.
- Gaudieri, P.A., et al., 2008. Cognitive function in children with type 1 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 31, 1892-7.
- Gheyara, A.L., et al., 2014. Tau reduction prevents disease in a mouse model of Dravet syndrome. *Ann Neurol.* 76, 443-56.
- Gillespie, J.W., et al., 2002. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *Am J Pathol.* 160, 449-57.
- Glennner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 120, 885-90.
- Goate, A., 2006. Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 9, 341-7.
- Goding, J.W., 1996. Immunohistology. *Monoclonal Antibodies (Third Edition) : Principles and Practice.* 400-423.
- Goedert, M., et al., 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 3, 519-26.
- Goedert, M., Jakes, R., 1990. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225-30.
- Goedert, M., et al., 1992. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron.* 8, 159-68.
- Goedert, M., et al., 1994. Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem J.* 301 (Pt 3), 871-7.
- Goedert, M., et al., 1997. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 409, 57-62.
- Gong, C.X., et al., 1993. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem.* 61, 921-7.
- Goto, S., Hirano, A., Rojas-Corona, R.R., 1989. An immunohistochemical investigation of the human neostriatum in Huntington's disease. *Ann Neurol.* 25, 298-304.
- Gratuze, M., et al., 2015. Tau hyperphosphorylation and deregulation of calcineurin in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 24, 86-99.
- Gratuze, M., et al., 2016. Is Huntington's disease a tauopathy? *Brain.* 139, 1014-25.
- Gratuze, M., et al., 2017. Tau hyperphosphorylation in the brain of ob/ob mice is due to hypothermia: Importance of thermoregulation in linking diabetes and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 98, 1-8.
- Greenberg, S.G., Davies, P., 1990. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 5827-31.
- Greenwood, J.A., Johnson, G.V., 1995. Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp Cell Res.* 220, 332-7.
- Grundke-Iqbal, I., et al., 1986a. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* 261, 6084-9.

- Grundke-Iqbal, I., et al., 1986b. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83, 4913-7.
- Gu, Y., Oyama, F., Ihara, Y., 1996. Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem*. 67, 1235-44.
- Guillozet-Bongaarts, A.L., et al., 2006. Pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: in vitro evidence and implications for tangle formation in vivo. *J Neurochem*. 97, 1005-14.
- Gusella, J.F., et al., 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*. 306, 234-8.
- Hanger, D.P., Anderton, B.H., Noble, W., 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*. 15, 112-9.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 256, 184-5.
- Harvey, R.J., Skelton-Robinson, M., Rossor, M.N., 2003. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 74, 1206-9.
- Hernandez-Rapp, J., et al., 2016. microRNA-132/212 deficiency enhances A β production and senile plaque deposition in Alzheimer's disease triple transgenic mice. *Sci Rep*. 6, 30953.
- Hickey, W.F., et al., 1983. Immunohistochemical application of monoclonal antibodies against myelin basic protein and neurofilament triple protein subunits: advantages over antisera and technical limitations. *J Histochem Cytochem*. 31, 1126-35.
- Hirokawa, N., et al., 1996. Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol*. 132, 667-79.
- Hobro, A.J., Smith, N.I., 2017. An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vibrational Spectroscopy*. 91, 31-35.
- Hodges, A., et al., 2006. Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet*. 15, 965-77.
- Hoetelmans, R.W., et al., 2001. Effects of acetone, methanol, or paraformaldehyde on cellular structure, visualized by reflection contrast microscopy and transmission and scanning electron microscopy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 9, 346-51.
- Hof, P.R., et al., 1992. Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neurosci Lett*. 139, 10-4.
- Holth, J.K., et al., 2013. Tau loss attenuates neuronal network hyperexcitability in mouse and *Drosophila* genetic models of epilepsy. *J Neurosci*. 33, 1651-9.
- Hong, M., et al., 1998. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science*. 282, 1914-7.
- Hoover, B.R., et al., 2010. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*. 68, 1067-81.
- Howat, W.J., Wilson, B.A., 2014. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. 70, 12-9.
- Hussain, I., et al., 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci*. 14, 419-27.

- Hyman, B.T., Trojanowski, J.Q., 1997. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56, 1095-7.
- Ihara, Y., et al., 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem.* 99, 1807-10.
- Ingelson, M., Vanmechelen, E., Lannfelt, L., 1996. Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci Lett.* 220, 9-12.
- Irwin, D.J., et al., 2013. Acetylated tau neuropathology in sporadic and hereditary tauopathies. *Am J Pathol.* 183, 344-51.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Gotz, J., 2009. Phosphorylated Tau interacts with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 284, 20909-16.
- Ittner, L.M., et al., 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell.* 142, 387-97.
- Jack, C.R., Jr., et al., 2008. 11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain.* 131, 665-80.
- Jacobs, M., et al., 2016. Progression of motor subtypes in Huntington's disease: a 6-year follow-up study. *J Neurol.* 263, 2080-5.
- Jellinger, K.A., 1998. Alzheimer-type lesions in Huntington's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 105, 787-99.
- Jenkins, S.M., et al., 2000. Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J.* 345 Pt 2, 263-70.
- Jicha, G.A., et al., 1997. A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 69, 2087-95.
- Joachim, C.L., et al., 1987. Tau epitopes are incorporated into a range of lesions in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 46, 611-22.
- Johnson, G.V., et al., 1997. The tau protein in human cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease consists of proteolytically derived fragments. *J Neurochem.* 68, 430-3.
- Josephs, K.A., et al., 2015. TAR DNA-binding protein 43 and pathological subtype of Alzheimer's disease impact clinical features. *Ann Neurol.* 78, 697-709.
- Jost, B.C., Grossberg, G.T., 1995. The natural history of Alzheimer's disease: a brain bank study. *J Am Geriatr Soc.* 43, 1248-55.
- Julien, C., Bretteville, A., Planel, E., 2012. Biochemical isolation of insoluble tau in transgenic mouse models of tauopathies. *Methods Mol Biol.* 849, 473-91.
- Kadavath, H., et al., 2015. Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 7501-6.
- Kanaan, N.M., et al., 2011. Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *J Neurosci.* 31, 9858-68.
- Kanemaru, K., et al., 1992. Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem.* 58, 1667-75.
- Kayed, R., et al., 2009. Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J Biol Chem.* 284, 4230-7.

- Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1992. Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem.* 59, 750-3.
- Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1994. Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett.* 351, 80-4.
- Kidd, M., 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 197, 192-3.
- Kiernan, J.A., 2003. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today.* 1, 8-12.
- Kimura, T., et al., 2014. Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369, 20130144.
- Kloppel, S., et al., 2015. Compensation in Preclinical Huntington's Disease: Evidence From the Track-On HD Study. *EBioMedicine.* 2, 1420-9.
- Knops, J., et al., 1991. Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol.* 114, 725-33.
- Kondo, A., et al., 2015. Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy. *Nature.* 523, 431-436.
- Kondratieck, C.M., Vandre, D.D., 1996. Alzheimer's disease neurofibrillary tangles contain mitosis-specific phosphoepitopes. *J Neurochem.* 67, 2405-16.
- Konzack, S., et al., 2007. Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons. *J Neurosci.* 27, 9916-27.
- Kopke, E., et al., 1993. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 268, 24374-84.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., Selkoe, D.J., 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 4044-8.
- Kosik, K.S., et al., 1989a. Tau in situ hybridization in normal and Alzheimer brain: localization in the somatodendritic compartment. *Ann Neurol.* 26, 352-61.
- Kosik, K.S., et al., 1989b. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron.* 2, 1389-97.
- Kremer, A., et al., 2011. Early improved and late defective cognition is reflected by dendritic spines in Tau.P301L mice. *J Neurosci.* 31, 18036-47.
- Ksiezak-Reding, H., Liu, W.K., Yen, S.H., 1992. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* 597, 209-19.
- L'Episcopo, F., et al., 2016. GSK-3beta-induced Tau pathology drives hippocampal neuronal cell death in Huntington's disease: involvement of astrocyte-neuron interactions. *Cell Death Dis.* 7, e2206.
- Larson, M.E., et al., 2012. Soluble alpha-synuclein is a novel modulator of Alzheimer's disease pathophysiology. *J Neurosci.* 32, 10253-66.
- Ledesma, M.D., Bonay, P., Avila, J., 1995. Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *J Neurochem.* 65, 1658-64.
- Lee, G., Cowan, N., Kirschner, M., 1988. The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science.* 239, 285-8.

- Lee, V.M., et al., 1991. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*. 251, 675-8.
- Lee, V.M., Goedert, M., Trojanowski, J.Q., 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*. 24, 1121-59.
- Lei, P., et al., 2012. Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med*. 18, 291-5.
- Leroy, K., et al., 2012. Lack of tau proteins rescues neuronal cell death and decreases amyloidogenic processing of APP in APP/PS1 mice. *Am J Pathol*. 181, 1928-40.
- Levitt, D., King, M., 1987. Methanol fixation permits flow cytometric analysis of immunofluorescent stained intracellular antigens. *J Immunol Methods*. 96, 233-7.
- Li, J., et al., 2003. Post-mortem interval effects on the phosphorylation of signaling proteins. *Neuropsychopharmacology*. 28, 1017-25.
- Li, X., et al., 2011. Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *EMBO J*. 30, 4825-37.
- Lievens, J.C., et al., 2002. Abnormal phosphorylation of synapsin I predicts a neuronal transmission impairment in the R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Cell Neurosci*. 20, 638-48.
- Lim, D., et al., 2008. Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *J Biol Chem*. 283, 5780-9.
- Lim, N.K., et al., 2014. Localized changes to glycogen synthase kinase-3 and collapsin response mediator protein-2 in the Huntington's disease affected brain. *Hum Mol Genet*. 23, 4051-63.
- Ling, H., et al., 2015. Histological evidence of chronic traumatic encephalopathy in a large series of neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*. 130, 891-3.
- Litman, P., et al., 1993. Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron*. 10, 627-38.
- Liu, C., Gotz, J., 2013. Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. *PLoS One*. 8, e84849.
- Liu, F., et al., 2002. Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience*. 115, 829-37.
- Liu, F., et al., 2004. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 10804-9.
- Loomis, P.A., et al., 1990. Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87, 8422-6.
- LoPresti, P., et al., 1995. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92, 10369-73.
- Lu, P.J., et al., 1999. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*. 399, 784-8.
- Luo, S., et al., 2005. Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *J Cell Biol*. 169, 647-56.
- Luthi-Carter, R., et al., 2000. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 9, 1259-71.
- Magnani, E., et al., 2007. Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J*. 26, 4546-54.

- Mailliot, C., et al., 1998. Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Lett.* 433, 201-4.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 2012. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2, a006247.
- Mandell, J.W., Banker, G.A., 1996. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci.* 16, 5727-40.
- Martin, L., Latypova, X., Terro, F., 2011. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 58, 458-71.
- Mason, J.T., O'Leary, T.J., 1991. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem.* 39, 225-9.
- Mason, S.L., et al., 2015. The role of the amygdala during emotional processing in Huntington's disease: from pre-manifest to late stage disease. *Neuropsychologia.* 70, 80-9.
- Masters, C.L., et al., 2015. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers.* 1, 15056.
- Matsuo, E.S., et al., 1994. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron.* 13, 989-1002.
- McKhann, G., et al., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 34, 939-44.
- McKhann, G.M., et al., 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7, 263-9.
- Meade, A.D., et al., 2010. Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 396, 1781-91.
- Mehrabi, N.F., et al., 2016. Symptom heterogeneity in Huntington's disease correlates with neuronal degeneration in the cerebral cortex. *Neurobiol Dis.* 96, 67-74.
- Min, S.W., et al., 2010. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron.* 67, 953-66.
- Mitchell, I.J., Cooper, A.J., Griffiths, M.R., 1999. The selective vulnerability of striatopallidal neurons. *Prog Neurobiol.* 59, 691-719.
- Morita, T., Sobue, K., 2009. Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J Biol Chem.* 284, 27734-45.
- Morris, M., et al., 2015. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci.* 18, 1183-9.
- Moss, R.J., Mastri, A.R., Schut, L.J., 1988. The coexistence and differentiation of late onset Huntington's disease and Alzheimer's disease. A case report and review of the literature. *J Am Geriatr Soc.* 36, 237-41.
- Myers, R.H., et al., 1985. Late onset of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 48, 530-4.
- Namimatsu, S., Ghazizadeh, M., Sugisaki, Y., 2005. Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method. *J Histochem Cytochem.* 53, 3-11.

- Nangaku, M., et al., 1994. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell*. 79, 1209-20.
- Neve, R.L., et al., 1986. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res*. 387, 271-80.
- Niblock, M., Gallo, J.M., 2012. Tau alternative splicing in familial and sporadic tauopathies. *Biochem Soc Trans*. 40, 677-80.
- Noguchi, M., et al., 1997. Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol Int*. 47, 685-91.
- Orstavik, T.B., et al., 1981. Effects of different tissue processing methods on the immunohistochemical localization of kallikrein in the pancreas. *J Histochem Cytochem*. 29, 985-8.
- Orth, M., et al., 2010. Observing Huntington's Disease: the European Huntington's Disease Network's REGISTRY. *PLoS Curr*. 2, RRN1184.
- Papasozomenos, S.C., Binder, L.I., 1987. Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton*. 8, 210-26.
- Papoutsis, M., et al., 2014. The cognitive burden in Huntington's disease: pathology, phenotype, and mechanisms of compensation. *Mov Disord*. 29, 673-83.
- Park, S.A., Ahn, S.I., Gallo, J.M., 2016. Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *BMB Rep*. 49, 405-13.
- Penney, J.B., Jr., et al., 1997. CAG repeat number governs the development rate of pathology in Huntington's disease. *Ann Neurol*. 41, 689-92.
- Petry, F.R., et al., 2014. Specificity of anti-tau antibodies when analyzing mice models of Alzheimer's disease: problems and solutions. *PLoS One*. 9, e94251.
- Pikkarainen, M., Martikainen, P., Alafuzoff, I., 2010. The effect of prolonged fixation time on immunohistochemical staining of common neurodegenerative disease markers. *J Neuropathol Exp Neurol*. 69, 40-52.
- Planel, E., et al., 2004. Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 24, 2401-11.
- Planel, E., et al., 2007. Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci*. 27, 3090-7.
- Poorkaj, P., et al., 2001. A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau. *Mamm Genome*. 12, 700-12.
- Qian, W., Liu, F., 2014. Regulation of alternative splicing of tau exon 10. *Neurosci Bull*. 30, 367-77.
- Rait, V.K., et al., 2006. Conversions of formaldehyde-modified 2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate in conditions modeling formalin-fixed tissue dehydration. *J Histochem Cytochem*. 54, 301-10.
- Ranen, N.G., et al., 1995. Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet*. 57, 593-602.
- Ready, R.E., et al., 2008. Patient and caregiver quality of life in Huntington's disease. *Mov Disord*. 23, 721-6.
- Reyes, J.F., et al., 2012. Selective tau tyrosine nitration in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol*. 123, 119-32.
- Roberson, E.D., et al., 2007. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 316, 750-4.

- Rocca, W.A., et al., 1991. Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann Neurol.* 30, 381-90.
- Rogaev, E.I., et al., 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 376, 775-8.
- Rosas, H.D., et al., 2008. Complexity and heterogeneity: what drives the ever-changing brain in Huntington's disease? *Ann N Y Acad Sci.* 1147, 196-205.
- Rosenblatt, A., et al., 2012. Age, CAG repeat length, and clinical progression in Huntington's disease. *Mov Disord.* 27, 272-6.
- Ross, C.A., Tabrizi, S.J., 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 10, 83-98.
- Rossetti, H.C., et al., 2010. The CERAD Neuropsychologic Battery Total Score and the progression of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 24, 138-42.
- Schmidt, M.L., et al., 1987. Phosphate dependent and independent neurofilament epitopes in the axonal swellings of patients with motor neuron disease and controls. *Lab Invest.* 56, 282-94.
- Schwab, C., et al., 2008. Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67, 1159-65.
- Selkoe, D.J., 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci.* 924, 17-25.
- Semaka, A., et al., 2006. Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles. *Clin Genet.* 70, 283-94.
- Sergeant, N., et al., 1995. Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *Neuroreport.* 6, 2217-20.
- Sergeant, N., et al., 1997. 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.* 69, 834-44.
- Sindou, P., et al., 1992. A dose-dependent increase of Tau immunostaining is produced by glutamate toxicity in primary neuronal cultures. *Brain Res.* 572, 242-6.
- Sjoberg, M.K., et al., 2006. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci.* 119, 2025-34.
- Sontag, E., et al., 2004. Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63, 1080-91.
- Sotiropoulos, I., et al., 2017. Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol Commun.* 5, 91.
- Spencer, P.S., 1987. Guam ALS/parkinsonism-dementia: a long-latency neurotoxic disorder caused by "slow toxin(s)" in food? *Can J Neurol Sci.* 14, 347-57.
- Spires-Jones, T.L., Attems, J., Thal, D.R., 2017. Interactions of pathological proteins in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 134, 187-205.
- Spocter, M.A., et al., 2012. Neuropil distribution in the cerebral cortex differs between humans and chimpanzees. *J Comp Neurol.* 520, 2917-29.
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S., 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 161, 1961-71.

- St-Amour, I., et al., 2018. Co-occurrence of mixed proteinopathies in late-stage Huntington's disease. *Acta Neuropathol.* 135, 249-265.
- St-Laurent, J., et al., 2006. Comparison of cell fixation methods of induced sputum specimens: an immunocytochemical analysis. *J Immunol Methods.* 308, 36-42.
- Stamer, K., et al., 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol.* 156, 1051-63.
- Sultan, A., et al., 2011. Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem.* 286, 4566-75.
- Suthipintawong, C., Leong, A.S., Vinyuvat, S., 1996. Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol.* 15, 167-74.
- Suzuki, N., et al., 1994. High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol.* 145, 452-60.
- Tabrizi, S.J., et al., 2009. Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *Lancet Neurol.* 8, 791-801.
- Tada, M., et al., 2012. Coexistence of Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study. *Acta Neuropathol.* 124, 749-60.
- Tanaka, Y., et al., 1998. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell.* 93, 1147-58.
- Thavarajah, R., et al., 2012. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 16, 400-5.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.* 72, 971-83.
- Thies, E., Mandelkow, E.M., 2007. Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1. *J Neurosci.* 27, 2896-907.
- Tomas-Zapico, C., et al., 2012. alpha-Synuclein accumulates in huntingtin inclusions but forms independent filaments and its deficiency attenuates early phenotype in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 21, 495-510.
- Trabzuni, D., et al., 2012. MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet.* 21, 4094-103.
- Tremblay, C., et al., 2017. Association of Neuropathological Markers in the Parietal Cortex With Antemortem Cognitive Function in Persons With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*
- Troiano, N.W., Ciovacco, W.A., Kacena, M.A., 2009. The Effects of Fixation and Dehydration on the Histological Quality of Undecalcified Murine Bone Specimens Embedded in Methylmethacrylate. *J Histotechnol.* 32, 27-31.
- Trojanowski, J.Q., Walkenstein, N., Lee, V.M., 1986. Expression of neurofilament subunits in neurons of the central and peripheral nervous system: an immunohistochemical study with monoclonal antibodies. *J Neurosci.* 6, 650-60.
- Trojanowski, J.Q., et al., 1989. Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem.* 37, 209-15.

- Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1995. Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J.* 9, 1570-6.
- Uematsu, M., et al., 2018. Brainstem tau pathology in Alzheimer's disease is characterized by increase of three repeat tau and independent of amyloid beta. *Acta Neuropathol Commun.* 6, 1.
- Urieli-Shoval, S., et al., 1992. Preservation of RNA for in situ hybridization: Carnoy's versus formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* 40, 1879-85.
- Utton, M.A., et al., 2005. Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *J Cell Sci.* 118, 4645-54.
- van der Burg, J.M., Bjorkqvist, M., Brundin, P., 2009. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 8, 765-74.
- van der Loos, C.M., 2007. A focus on fixation. *Biotech Histochem.* 82, 141-54.
- Vanier, M.T., et al., 1998. Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J Cell Sci.* 111 (Pt 10), 1419-32.
- Vassar, R., 2014. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 6, 89.
- Vershinin, M., et al., 2007. Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 87-92.
- Vielkind, U., Swierenga, S.H., 1989. A simple fixation procedure for immunofluorescent detection of different cytoskeletal components within the same cell. *Histochemistry.* 91, 81-8.
- Vincent, I., Rosado, M., Davies, P., 1996. Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *J Cell Biol.* 132, 413-25.
- Viola, K.L., Klein, W.L., 2015. Amyloid beta oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol.* 129, 183-206.
- Violet, M., et al., 2014. A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front Cell Neurosci.* 8, 84.
- Vonsattel, J.P., et al., 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 44, 559-77.
- Vuono, R., et al., 2015. The role of tau in the pathological process and clinical expression of Huntington's disease. *Brain.* 138, 1907-18.
- Waldvogel, H.J., et al., 2012. Selective neurodegeneration, neuropathology and symptom profiles in Huntington's disease. *Adv Exp Med Biol.* 769, 141-52.
- Walsh, J.S., Welch, H.G., Larson, E.B., 1990. Survival of outpatients with Alzheimer-type dementia. *Ann Intern Med.* 113, 429-34.
- Wang, Y., et al., 2015. Rapid alteration of protein phosphorylation during postmortem: implication in the study of protein phosphorylation. *Sci Rep.* 5, 15709.
- Wang, Y., Mandelkow, E., 2016. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci.* 17, 5-21.
- Warby, S.C., Graham, R.K., Hayden, M.R., 1993. Huntington Disease. In: *GeneReviews(R)*. Vol., M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya, ed.^eds., Seattle (WA).
- Watanabe, A., et al., 2004. Molecular aging of tau: disulfide-independent aggregation and non-enzymatic degradation in vitro and in vivo. *J Neurochem.* 90, 1302-11.
- Weingarten, M.D., et al., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72, 1858-62.

- Whiteman, I.T., et al., 2009. Activated actin-depolymerizing factor/cofilin sequesters phosphorylated microtubule-associated protein during the assembly of alzheimer-like neuritic cytoskeletal striations. *J Neurosci.* 29, 12994-3005.
- Wild, E.J., et al., 2015. Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients. *J Clin Invest.* 125, 1979-86.
- Xifro, X., et al., 2009. Reduced calcineurin protein levels and activity in exon-1 mouse models of Huntington's disease: role in excitotoxicity. *Neurobiol Dis.* 36, 461-9.
- Xuereb, J.H., et al., 1996. Neuropathological diagnosis and CAG repeat expansion in Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 60, 78-81.
- Yamada, K., et al., 2011. In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *J Neurosci.* 31, 13110-7.
- Yan, S.D., et al., 1995. Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat Med.* 1, 693-9.
- Yin, X., et al., 2012. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A) modulates serine/arginine-rich protein 55 (SRp55)-promoted Tau exon 10 inclusion. *J Biol Chem.* 287, 30497-506.
- Yoshiyama, Y., et al., 2007. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron.* 53, 337-51.
- Yoshizaki, C., Tsukane, M., Yamauchi, T., 2004. Overexpression of tau leads to the stimulation of neurite outgrowth, the activation of caspase 3 activity, and accumulation and phosphorylation of tau in neuroblastoma cells on cAMP treatment. *Neurosci Res.* 49, 363-71.
- Yuan, A., et al., 2008. Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci.* 28, 1682-7.
- Yuzwa, S.A., et al., 2014. O-GlcNAc modification of tau directly inhibits its aggregation without perturbing the conformational properties of tau monomers. *J Mol Biol.* 426, 1736-52.
- Zheng, Z., Diamond, M.I., 2012. Huntington disease and the huntingtin protein. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 107, 189-214.
- Zhong, Q., et al., 2012. Tau isoform composition influences rate and extent of filament formation. *J Biol Chem.* 287, 20711-9.
- Zhou, Z.D., et al., 2011. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr.* 5, 280-92.
- Zuccato, C., Valenza, M., Cattaneo, E., 2010. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev.* 90, 905-81.