

Université de Montréal

**La sécrétion de la protéine tau : mécanisme de propagation
de la pathologie de tau dans la maladie d'Alzheimer**

par Nguyen-Vi MOHAMED

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Pathologie et Biologie Cellulaire

Avril 2016

©Nguyen-Vi MOHAMED, 2016

Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

**La sécrétion de la protéine tau : mécanisme de propagation
de la pathologie de tau dans la maladie d'Alzheimer**

Présentée par

Nguyen-Vi MOHAMED

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Grégory EMERY, Président rapporteur
Dr. Nicole LECLERC, Directrice de recherche
Dr. Charles RAMASSAMY, Membre du jury
Dr. Luc BUEE, Examineur externe
Dr. Benjamin ELLEZAM, Représentant du doyen

Résumé

Dans la maladie d'Alzheimer, il existe deux marqueurs histopathologiques : les plaques amyloïdes composées de la protéine amyloïde-bêta et les enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) composés de la protéine tau agrégée. Dans le cerveau, la propagation de la pathologie de tau est observée le long des circuits neuronaux connectés synaptiquement, selon une séquence de stades, caractérisés par le Docteur Braak en 1991. Chez les patients, le degré de démence corrèle avec le nombre de NFTs. Ces derniers apparaissent dans des régions précises du cerveau et se propagent, de manière prédictible, le long des projections neuronales à des stades plus tardifs de la pathologie. Il reste à éclaircir la manière dont les NFTs se propagent dans les différentes régions du cerveau.

Dans notre laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que la propagation de tau pourrait se produire par un processus de transmission de cellule à cellule. Ainsi, la protéine tau serait tout d'abord sécrétée par un neurone, puis endocytée par un neurone adjacent. Nos travaux de recherche se sont concentrés sur la sécrétion de la protéine tau.

Dans une première étape, nous avons démontré l'existence de la sécrétion active de tau dans l'espace extracellulaire, en utilisant des modèles *in vitro* de cellules non neuronales et neuronales. Par la suite, nous avons caractérisé les formes de protéines tau sécrétées. Enfin dans un dernier temps, nous avons exploré les voies de sécrétion de la protéine tau ainsi que les mécanismes régulant ce phénomène. Nous avons réussi à moduler la sécrétion de tau en reproduisant plusieurs insultes observées dans la maladie d'Alzheimer. Nos recherches nous ont permis d'identifier l'appareil de Golgi comme étant une organelle dont la fragmentation augmente la sécrétion de la protéine tau. A la lumière de cette découverte, nous avons été capable de moduler la sécrétion de tau en ciblant spécifiquement l'activité de cdk5 et l'expression de rab1A contrôlant la morphologie du Golgi. Ainsi, nous avons réussi à diminuer significativement la sécrétion de la protéine tau.

Nos travaux de recherche proposent de nouvelles cibles thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer, visant à diminuer la propagation de la pathologie de tau par de nouveaux mécanismes cellulaires.

Mots-clés : tau, maladie d'Alzheimer, sécrétion, propagation

Abstract

In Alzheimer's disease, the amyloid plaques and the neurofibrillary tangles composed of misfolded aggregated tau protein are the two hallmarks of the pathology. In the brain, the propagation of tau pathology was observed along the neuronal circuits. Described by Doctor Braak in 1991, the appearance of the neurofibrillary tangles was predictable in the brain and correlated with the degree of cognitive deficits. It remains unclear how tau pathology spreads in the brain.

In our laboratory, we made the hypothesis that the propagation could occur by cell-to-cell transmission. This implies that NFTs would propagate in the brain by the release of misfolded tau aggregates from an affected neuron followed by its uptake in neighboring neurons. My thesis focuses on the mechanism of tau secretion. Firstly, we demonstrated that tau was actively secreted in the extracellular space by non neuronal cells and primary neurons. Then, we characterized the tau secreted forms. Finally, we explored the secretory pathways and the mechanisms leading to tau secretion. We were able to modulate tau secretion by mimicking specific insults observed in Alzheimer disease. Our research led us to identify the Golgi apparatus as a major contributor to tau secretion. Concomitant with this, modulation of cdk5 pathway and rab1A expression, which are known to affect the Golgi morphology, altered significantly tau secretion.

Our research provides new therapeutic strategies for Alzheimer's disease, targeting tau secretion to reduce the propagation of tau pathology by new cellular mechanisms.

Keywords : tau, Alzheimer's disease, secretion, propagation

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Table des matières.....	3
Liste des figures	7
Liste des abréviations.....	8
Remerciements.....	9
Dédicace.....	12
I. Introduction	13
I.1. Maladie d'Alzheimer.....	13
I.1.1 Épidémiologie, impact socio-économique et diagnostic clinique	13
I.1.2 Génétique de la maladie d'Alzheimer	14
I.1.3 Essais thérapeutiques : la nécessité de développer de nouvelles cibles précoces	14
I.1.4 Dysfonctionnement neuronal et neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer : des évènements cellulaires multiples	16
I.1.4.1 Lésions neuropathologiques : plaques amyloïdes et enchevêtrements neurofibrillaires.....	16
I.1.4.1.1 Les dépôts amyloïdes.....	17
I.1.4.1.2 Les enchevêtrements neurofibrillaires.....	19
I.1.4.2 Perturbation de l'autophagie dans la maladie d'Alzheimer.....	19
I.1.4.3 Perturbation des structures membranaires dans la maladie d'Alzheimer	20
I.1.4.3.1 Perturbation de la voie endosomale et de la voie lysosomale	20
I.1.4.3.2 Dysfonctionnement mitochondrial : impact sur le métabolisme neuronal .	21
I.1.4.3.3 Perturbation de l'appareil de Golgi : fragmentation dans la maladie d'Alzheimer	22
• <i>Le rôle physiologique de l'appareil de Golgi</i>	22
• <i>L'appareil de Golgi dans la maladie d'Alzheimer</i>	22

• <u>Modulation de la structure de l'appareil de Golgi</u>	24
I.2. Protéine tau intracellulaire: du rôle physiologique à la pathologie	26
I.2.1 Structure, localisation, et fonctions de la protéine tau intracellulaire en conditions physiologiques	26
I.2.1.1 Gène et épissage alternatif de tau	26
I.2.1.2 Structure de tau	27
I.2.1.3 Localisation et fonction de tau.....	28
• <u>Tau au cytosquelette et aux membranes</u>	28
• <u>Tau au noyau</u>	29
• <u>Tau lors du développement</u>	30
I.2.1.4 Modification post-traductionnelle de tau la plus fréquente : la phosphorylation	30
I.2.2 Structure, localisation et fonctions de la protéine tau intracellulaire en conditions pathologiques	31
I.2.2.1 Gène et mutations de tau dans les démences	31
I.2.2.2 Phosphorylation de tau dans la maladie d'Alzheimer	32
I.2.2.3 Agrégats de tau dans la pathologie	34
I.3 Théorie de la propagation de la pathologie de tau et protéine tau extracellulaire : un nouvel aspect de la pathologie	35
I.3.1 Théorie de la propagation de la pathologie tau.....	35
I.3.2 La protéine tau extracellulaire en conditions pathologiques : un nouvel aspect de la propagation de la maladie d'Alzheimer	37
I.3.3 Les modèles d'étude in vivo de la propagation de la pathologie de tau	39
I.3.4 L'endocytose de tau	41
I.3.5 La sécrétion de tau in vitro et sa caractérisation : les données de 2010 à avril 2012, précédant notre première publication de doctorat.....	42
I.3.6 Les voies de sécrétion de la protéine tau extracellulaire : évidences pour les voies non conventionnelles	42
I.4 Hypothèse, Objectifs de travail et Introduction de l' étude	46
• <u>Hypothèse</u> :	46
• <u>Objectif de travail</u> :	46

• <u>Introduction de l'étude</u>	46
I.5 Contribution aux travaux	47
II. Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion	48
N-V. MOHAMED, V. PLOUFFE et al, Plos One 2012.....	48
III. Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons.....	81
N-V. MOHAMED et al, Scientific Reports 2014.....	81
IV. The Golgi fragmentation increases tau secretion.....	110
N-V. MOHAMED et al, Soumis dans The Journal of Neuroscience en Avril 2016.....	110
V. Conclusions.....	147
V.1 Conclusions de l'étude « Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion » publiée en 2012 dans PlosOne.....	147
V.2 Conclusions de l'étude « Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons » publiée en 2014 dans Scientific Reports	148
V.3 Conclusions de l'étude « Golgi fragmentation increases tau secretion » Soumis dans The Journal of Neuroscience en avril 2016	149
VI. Discussion et Perspectives.....	150
VI.1 La sécrétion de tau et sa caractérisation : les données de 2012 à avril 2016.....	150
VI.1.1 Clivage et phosphorylation de la protéine tau sécrétée	150
VI.1.2 La sécrétion de tau <i>in vitro</i> : influence des isoformes, mutations et modifications post-traductionnelles intracellulaires	151
VI.1.3 Autres modifications post-traductionnelles de tau pouvant contribuer à la sécrétion	152
VI.1.4 Localisation de la sécrétion et de l'endocytose de tau.....	154
VI.1.5 La voie non conventionnelle de sécrétion des ectosomes/exosomes et les vésicules extracellulaires	156
VI.2 Les modèles d'étude de la sécrétion de tau : de l' <i>in vitro</i> , à l' <i>in vivo</i> , aux modèles humains.....	158
VI.3 La contribution toxique de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer.....	159

VI.4 La relation entre A β et tau dans la maladie d'Alzheimer : l' appareil de Golgi, un carrefour de la propagation de la pathologie et une cible potentielle	161
VI.4.1 L' appareil de Golgi, un carrefour de la propagation de la pathologie de tau et de la pathologie amyloïde.....	161
VI.4.2 Cdk5 une piste pour moduler l'appareil de Golgi dans la pathologie de tau et la pathologie amyloïde.....	162
VI.4.3 Les protéines Rabs : une piste pour moduler l'appareil de Golgi dans la pathologie de tau et la pathologie amyloïde	165
Bibliographie.....	166

Liste des figures

Figure1. Histologie des lésions neuropathologiques dans un cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer.

Figure2. Clivage de l'APP : voie amyloïdogénique et voie non-amyloïdogénique

Figure3. Le gène et les isoformes de tau

Figure4. Structure de tau

Figure5. Propagation de la pathologie de tau dans la maladie d'Alzheimer

Figure6. Les voies de sécrétion non-conventionnelles de la protéine tau

Liste des abréviations

MA : Maladie d'Alzheimer

A β : amyloïde-bêta

PS1: préséniline 1

PS2 : préséniline 2

APP : précurseur de la protéine amyloïde

GWAS : études d'association pangénomique

NFT : enchevêtrement neurofibrillaire

PHF : paires de filaments hélicoïdaux

DLFT : démence lobaire fronto-temporale

FDTP-17 : démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17

RE : réticulum endoplasmique

LDH : lactate déshydrogénase

MVB : corps multi-vésiculaires

Cdk5 : cycline-dépendante kinase 5

GSK3b : glycogène synthase kinase 3 bêta

PKA : protéine kinase A

PP2A : protéine phosphatase 2A

MAP : Microtubule Associated Protein

Tau : Tubulin Associated Unit

LCR : liquide céphalo-rachidien

O-GlcNAc : O-N-acétylglucosaminylation

LTP : potentialisation à long terme

Remerciements

Je souhaite avant tout exprimer ma profonde gratitude au Docteur Nicole Leclerc pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Grâce à Nicole, j'ai eu l'opportunité de découvrir et d'explorer une maladie neurodégénérative complexe. J'ai également eu l'opportunité fantastique de compléter une formation scientifique, parmi les plus réputées au monde. Ce doctorat a été riche d'apprentissage, de connaissances et de transversalité. Cette formation m'a également permise de contribuer à la société en contribuant aux connaissances sur la pathologie. Merci au Docteur Nicole Leclerc de m'avoir supportée tout au long de cette aventure et de m'avoir transmise le bagage nécessaire pour entreprendre et développer ma carrière scientifique. Merci de m'avoir faite rencontrer de grands scientifiques, de m'avoir aidée à construire un réseau scientifique et de m'avoir permise de diffuser mes recherches à travers les congrès nationaux et internationaux. Merci de m'avoir soutenue dans chacune de mes démarches académiques. Je suis, et serai toujours, extrêmement reconnaissante de l'enthousiasme et de la passion scientifique que vous m'avez transmise.

Merci également, au Docteur Emmanuel Planel, qui par collaboration, a contribué à ma seconde publication. Merci au Docteur Adriana Di Polo et au Docteur Roger Lippé d'avoir été mes parrains durant mon doctorat. Vous m'avez partagée vos solides critiques scientifiques qui m'ont permise d'avancer dans mes projets.

Merci aux organismes qui ont subventionné mes travaux de recherche et mon doctorat, et qui m'ont permise de me consacrer entièrement à mes études. Merci au Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (GRSNC), à la Faculté des études supérieures et post-doctorales (FESP), ainsi qu'au financement du laboratoire du Docteur Nicole LECLERC.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe, sans qui, toute cette aventure n'aurait pas été aussi enrichissante. Merci à Vanessa Plouffe de m'avoir transmise les fondements du projet de sécrétion de la protéine tau et de m'avoir permise de collaborer. Il n'y a pas eu, plus beau cadeau, que cette première publication scientifique où nous étions toutes les deux co-premières auteures. Ce fut une immense fierté et une joie de chaque instant partagée à deux. Grâce à Vanessa, j'ai découvert la valeur et la force inestimable d'une collaboration humaine et scientifique; qui m'a donnée le goût d'en initier d'autres. Merci

également à Johanne Bertrand qui m'a communiquée la rigueur du travail scientifique et transmise ses connaissances précieuses. Merci aux fabuleux techniciens Diane Gingras et Michel Lauzon pour avoir contribué à ma seconde publication, avec leurs expertises de pointe en microscopie électronique. Je suis fascinée à jamais par l'observation microscopique des organelles orchestrant la machinerie cellulaire. Merci également à Alexandre Desjardins, Lilia Rodriguez, et Sarika Garg pour leurs conseils et pour m'avoir transmise leurs propres bagages scientifiques durant les deux dernières années de doctorat. Grâce à vous, j'ai pu étendre mes champs de connaissances et développer un sens critique plus pointu et une plus grande perspicacité. Merci aux étudiants que j'ai formés, Alexandre Garreau, Aurélie Houle, Laïla Letaïef et Juliette Foucher Bricaud. Grâce à vous, j'ai fait l'apprentissage de la pédagogie et de la transmission du savoir et des techniques. Ce fut extrêmement intéressant et utile de se remettre en cause pour mieux transmettre. La joie dans vos yeux, lorsque vous réussissez vos premières expériences, m'a apportée une joie immense. Merci aux stagiaires d'été André-Anne Lefebvre et Benjamin Jacob d'avoir égayé l'été 2015. Merci en général pour l'esprit d'équipe qui nous a toujours lié, les uns aux autres, les jours de tempêtes comme les jours de grand soleil.

Je remercie également chaleureusement tous les étudiants du domaine que j'ai rencontré ces dernières années. Nous avons tant partagé, scientifiquement et personnellement, entre nos quotidiens au laboratoire, nos escapades culinaires, sportives, et/ou liquides. Sasha, Loïc, Arnaud, Cathou, Anaïs, Yous, Marc-André, Max, Laura, Sandra, Marius, Barbara, Ariel, Jessica, Jorge, Nico, Kessen, Martine, Stéphanie, Sasha bis, Alexandra la brune, Guillaume, Sabrina, Yoko.

Merci à ma famille, mes parents, Ludo, Annette, Lucas, Yvain et Fred pour m'avoir soutenue comme des piliers sans failles et d'avoir été mes fans inconditionnels pour chaque étape de ce parcours.

Merci à notre enfant franco-qubécois, la boulangerie Chez Fred, de m'avoir fournie sucres lents et rapides pour le marathon de thèse. Ce projet est né avec la thèse, s'est développé conjointement et prend également une nouvelle direction maintenant qu'elle s'achève.

Merci au Westmount Rugby Club de m'avoir faite découvrir une passion équilibrante, un corps sain, de m'avoir adoptée dans votre famille, et de me permettre de vivre des expériences pleines d'adrénaline, de m'enseigner la ténacité, de contribuer à ce que je me surpasse encore et toujours un peu plus.

Dédicace

Ce fut 5 années formidables de projets, de succès, de force, d'accomplissements et de tremplins pour l'avenir. Pour ces belles raisons, je dédicace donc ma thèse à tous ceux et celles qui l'ont égayée et qui l'ont composée à mes côtés.

I. Introduction

I.1. Maladie d'Alzheimer

I.1.1 Épidémiologie, impact socio-économique et diagnostic clinique

La maladie d'Alzheimer (MA) est la démence la plus répandue à travers le monde. A l'heure actuelle, elle toucherait près de 47 millions de personnes et coûterait 818 milliards de dollars à la société. Les prévisions sont sombres puisque le nombre de cas doublerait tous les 20 ans. En supposant qu'aucun traitement ne soit proposé dans les prochaines années, environ 130 millions de personnes seront concernées en 2050 (1–3).

La MA se caractérise par une neurodégénérescence progressive dans le cerveau. Les patients ont des symptômes qui évoluent et s'aggravent tout au long de la pathologie. Les signes caractéristiques de la maladie sont : des pertes de mémoire qui affectent la vie de tous les jours, des difficultés à exécuter les tâches quotidiennes, des troubles du langage, une désorientation spatio-temporelle, un jugement amoindri, des difficultés face aux notions abstraites, un rangement inapproprié des objets, des changements d'humeur et de comportement, des modifications de la personnalité, et de la perte d'initiative (4). Il est aujourd'hui impossible de prévoir individuellement les symptômes et leur évolution, bien qu'ils suivent généralement différents stades jusqu'à atteindre la perte d'autonomie complète des malades. Arrivé à ce stade, le patient doit être totalement pris en charge par sa famille et la société (5).

A ce jour, le diagnostic final est confirmé suite au décès du patient par analyse histopathologique du cerveau : la présence de dépôts amyloïdes ainsi que la présence de NFTs confirment la MA.

I.1.2 Génétique de la maladie d'Alzheimer

Dans plus de 90% des cas, la MA n'est pas héréditaire mais sporadique. C'est un ensemble d'évènements dont l'environnement, notre style de vie et le vieillissement de la population qui sont à l'origine de l'apparition et du développement de la MA (3).

Moins de 1% de la population est touchée par l'aspect familial héréditaire de la maladie (6, 7). Ainsi, avec l'avènement de la génétique, des altérations dans trois gènes familiaux ont été identifiés comme responsable du développement de la pathologie avant 60 ans : préséniline 1 (PS1) (8–10), préséniline 2 (PS2) (11, 12) et le précurseur de la protéine amyloïde (APP) (13–16). Des mutations dans ces trois gènes ou la duplication d' APP provoquent la MA de manière précoce (17–19).

Les études d'association pangénomique (GWAS) ont révélé qu'une trentaine de gènes pourrait jouer un rôle important dans le développement tardif de la MA. Ainsi, la découverte de ces gènes, a orienté vers des voies biologiques intéressantes à explorer dans la recherche. L'allèle epsilon 4 ($\epsilon 4$) du gène APOE a été identifié comme étant le principal facteur de risque de la forme sporadique de la MA. A l'aspect génétique s'ajoute le sexe de la personne. Ainsi, la présence de l'allèle $\epsilon 4$ de l'APOE est un facteur aggravant de la MA surtout chez la femme . La présence d'un seul allèle chez la femme est un facteur de risque bien plus important que chez l'homme (20). L'intervention de l'APOE dans l'amyloïdogénèse et son rôle cytotoxique est discuté dans de nombreuses études (20–26).

I.1.3 Essais thérapeutiques : la nécessité de développer de nouvelles cibles précoces

Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été tentées au cours des dernières années. Les essais cliniques se sont basés sur des anti-inflammatoires, des statines, des thérapies hormonales et des chélateurs. Les nombreux échecs pourraient s'expliquer par le fait que les molécules testées ciblaient seulement les symptômes, et produisaient de très nombreux effets secondaires, additionné à un coût-bénéfice trop élevé. L'échec des essais cliniques pourrait également s'expliquer par une inclusion de patients à un stade trop avancé et un défaut de diagnostique plus précoce. Ainsi, dans la littérature, nous pouvons trouver de nombreuses

analyses, parfois contradictoires sur l'efficacité des traitements. Nous discuterons de ceux basés sur les inhibiteurs de cholinestérase en exemple. Dans la MA, l'activité cholinergique est basse. Plusieurs essais thérapeutiques ont tenté d'augmenter l'activité cholinergique en inhibant la dégradation de l'acétylcholine. Les molécules comme la galanthamine ou la rivastigmine permettent cela. Les effets secondaires sont très importants et hétérogènes sur les cohortes de patients, et certaines études de rentabilité coût-bénéfice rendues négatives (27–32). Les analyses restent cependant très controversées et certains groupes soutiennent l'efficacité de ces drogues, ainsi que leur sécurité (33). En 2014, une étude en Grande-Bretagne a observé des changements cognitifs positifs dans une cohorte de patients lors de l'administration d'inhibiteur d'acétylcholinestérase (34).

Face à ces observations, les médecins, compagnies pharmaceutiques et chercheurs ont repensé leur stratégie. La recherche actuelle tente de diminuer la progression de la maladie ou de la prévenir à des stades plus précoces. Ainsi, les essais cliniques actuels s'orientent massivement sur les cibles histopathologiques que sont la protéine amyloïde et la protéine tau (tubuline associated unit). Les stratégies ciblant la protéine amyloïde visent : à diminuer sa production en agissant sur les sécrétases qui la produisent, à la dégrader ou à la séquestrer par immunothérapie passive et active, à bloquer la signalisation induite, ainsi qu' à inhiber son agrégation (35). Les échecs successifs des tests cliniques durant la dernière décennie, majoritairement focalisés sur le peptide A β , soulèvent la question de cibles potentiellement trop tardives dans la pathologie ou encore d'un problème d'hypothèse étiopathogénique. Les stratégies visant tau sont plus récentes et ciblent la diminution de son hyperphosphorylation et son agrégation, ainsi que sa séquestration par immunothérapie. Les résultats de ces derniers essais cliniques devraient être publiés en 2017.

Pour proposer des tests cliniques viables, il est essentiel de comprendre et d'explorer les pistes à l'origine du dysfonctionnement neuronal, en amont, qui conduisent à la neurodégénérescence.

I.1.4 Dysfonctionnement neuronal et neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer : des évènements cellulaires multiples

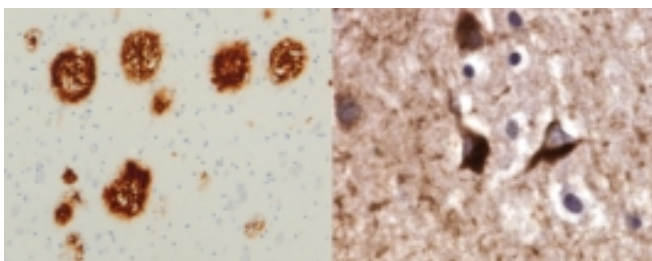
La MA est caractérisée par un dysfonctionnement des neurones et une neurodégénérescence progressive accompagnée d'une atrophie cérébrale (36). Avant que les symptômes cliniques se déclarent, un ensemble d'évènements cellulaires complexes et hétérogènes est observé dans le système nerveux central. Dans ce chapitre, nous présentons quelques évènements cellulaires suspectés de contribuer au dysfonctionnement neuronal conduisant à la neurodégénérescence.

I.1.4.1 Lésions neuropathologiques : plaques amyloïdes et enchevêtrements neurofibrillaires

En 1901, le médecin allemand Alois Alzheimer examina Auguste Deter, une patiente qui souffrait de graves troubles de mémoire. En 1906, lorsque celle-ci décéda, le psychiatre procéda à une autopsie du cerveau. Pour la première fois, il observa une atrophie du cortex cérébral et la présence de deux types de dépôts, marqués aux sels d'argent. Ces deux lésions histopathologiques seront par la suite identifiées, dans les années 1980, comme étant les plaques amyloïdes extracellulaires composées de la protéine amyloïde-bêta ($A\beta$) agrégée (37) et les NFTs intracellulaires composés de la protéine tau hyperphosphorylée agrégée (Figure1.) (38, 39).

Figure1. Histologie des lésions neuropathologiques dans un cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer.

Tiré et adapté de : Serrano-Pozo A et al, Cold Spring Harb Perspect Med. 2011



A gauche, nous observons une immunohistochimie révélant la présence de dépôts amyloïdes. A droite, nous observons la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires.

1.1.4.1.1 Les dépôts amyloïdes

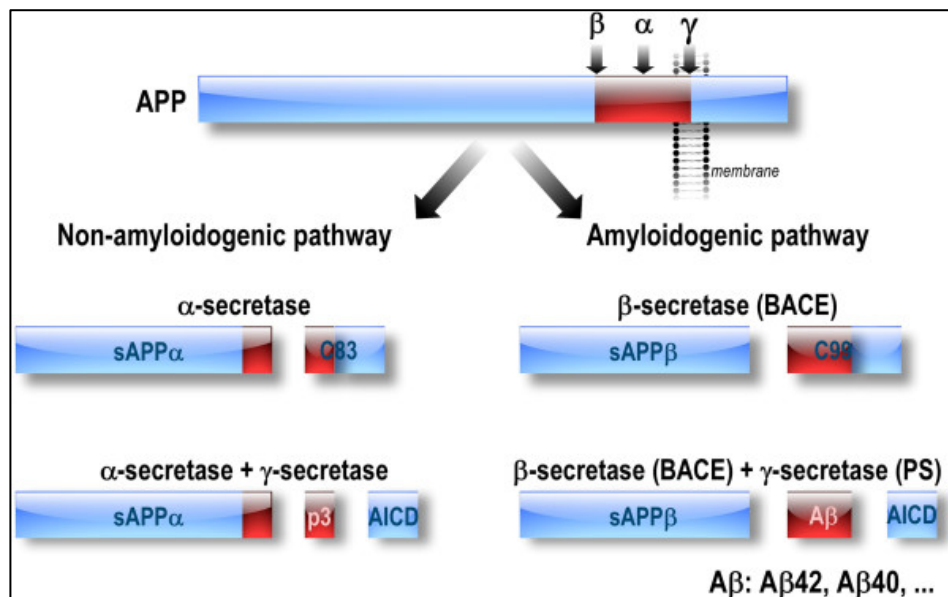
Le peptide A β est issu du clivage de la glycoprotéine transmembranaire APP (Amyloid Precursor Protein) par différentes sécrétases (Figure 2.). L'action de l' α -sécrétase et de la γ -sécrétase ne produit pas de peptide amyloïde. Cette voie est dite « non-amyloïdogénique ». La production du peptide amyloïde, ou voie amyloïdogénique, est issue du clivage successif de la protéine APP par la β et γ sécrétases. Cette protéolyse successive, augmentée dans la MA, est appelée cascade amyloïde (40–47). A β est une petite protéine de 39 à 43 acides aminés possédant différentes conformations. Les deux isoformes majeures de cette protéine sont la forme A β ₄₀, et la forme A β ₄₂. La fonction physiologique du peptide A β demeure inconnue mais l'agrégation de A β en plaques extracellulaires est considérée par de nombreux chercheurs comme étant la cause primaire de la neurotoxicité, puisqu'ils affecteraient le métabolisme cellulaire (48–51). En 2002, les formes dimères oligomères de l' A β ont été identifiées comme étant les formes les plus toxiques en affectant la transmission synaptique. Plusieurs études ont aussi démontré que A β favorise la formation de radicaux libres et que son accumulation peut déclencher une réponse inflammatoire chronique et un dysfonctionnement mitochondrial (52–60).

L'hypothèse de la pathogénicité du peptide amyloïde, comparée aux autres fragments produits lors des clivages physiologiques de l'APP, reste dominante et de nombreux essais cliniques ont été élaborés en conséquence pour séquestrer cette forme. Il existe une hypothèse selon laquelle la pathogénicité du peptide amyloïde est en amont de l'hyperphosphorylation de la protéine tau et de son agrégation. Le débat demeure cependant grandement ouvert (61, 62) et les essais cliniques sont restés infructueux à ce jour. En effet aucun des tests cliniques de phase 3 ciblant A β n'a montré de bénéfice significatif. Les spécialistes analysent ces échecs comme étant un mauvais choix de patients, d'agent, de cibles, de doses ou d'effets négatifs non prévus. Ainsi des molécules comme la semagacestat, ou l'avagacestat ciblant l'inhibition de la γ -sécrétase, ont produits des effets secondaires sur les patients en phase 3. Ceci peut s'expliquer par le fait que la γ -sécrétase possède de très nombreux substrats (35, 63–65). Les

inhibiteurs de la β -sécrétase sont actuellement en phase 3 d'essai clinique et il n'existe pas encore de rapport rendu. Les essais cliniques en phase 3 d'immunothérapie active et passive avec le solanezumab et crenezumab, sur des patients atteints de démences légères ou modérées, n'ont pas été concluantes pour les patients atteints de démences modérées. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces molécules ne sont efficaces que pour des atteintes précoces. Certains essais cliniques d'immunothérapie active ont été arrêtés très rapidement, comme avec AN-1792, puisque certains patients sont décédés en phase 1 et d'autres ont développé des méningites en phase 2. L'aducanumab est la molécule anti-amyloïde la plus prometteuse à ce jour en terme de bénéfice significatif. Il faut cependant rester prudent, car elle vient tout juste de rentrer en phase 3 d'essai clinique et son effet a été testé seulement aux États-Unis (35, 63–65).

Figure2. Clivage de l'APP : voie amyloïdogénique et voie non-amyloïdogénique

Tiré de : Del Prete et al. *Molecular Neurodegeneration* 2014, 9 :21



A gauche, le clivage de la protéine APP par l' α et la γ -sécrétase, ou voie « non amyloïdogénique », ne produit pas de peptide amyloïde. A droite, le clivage de la protéine APP par la β et γ -sécrétase, ou « voie amyloïdogénique » produit le peptide A β .

1.1.4.1.2 Les enchevêtrements neurofibrillaires

La deuxième lésion neuropathologique élémentaire identifiée est la présence de NFTs composés de la protéine tau hyperphosphorylée et agrégée. Ces NFTs sont insolubles et sont situés dans le cytoplasme des neurones (39, 66–69). La toxicité des NFTs n'a pas été démontrée à ce jour. Une théorie largement répandue soutient que les NFTs séquestrent les formes mal conformées de la protéine tau pour prévenir les cellules des dommages potentiels. Nous discuterons de la pathologie de tau dans les chapitres suivants.

Le développement des NFTs corrèle avec le degré de troubles cognitifs observés chez les patients. Ainsi, ils sont considérés par certains comme des marqueurs tardifs de la pathologie en réaction à des événements cellulaires précoces plus dommageables.

1.1.4.2 Perturbation de l'autophagie dans la maladie d'Alzheimer

L'autophagie est un processus essentiel pour l'homéostasie de la cellule. Elle a pour fonction de dégrader les protéines mal conformées, les organelles endommagées ou vieillissantes (70–75). Le flux autophagique est hautement dynamique et convoie des cargos cytosoliques qui mûrissent puis fusionnent aux lysosomes pour dégrader les éléments cellulaires (76, 77). Depuis les années 2010, plusieurs laboratoires ont décrit l'existence d'un défaut du processus autophagique dans les maladies neurodégénératives. Or le processus autophagique est essentiel à l'homéostasie des neurones et à leur survie (78, 79). Un défaut dans l'autophagie contribue à l'accumulation de l'agrégation des protéines, à l'accumulation de mitochondries défectueuses et au processus de neurodégénérescence (80–83). Dans la MA, il a été démontré qu'il existe une augmentation de la transcription de gènes régulant positivement l'autophagie (84). Celle-ci est potentiellement induite en réaction à l'accumulation de plaques amyloïdes et de radicaux libres. Un déficit lysosomal, ainsi qu'un déficit dans le transport lysosomal sont aussi à l'origine de renflements le long des prolongements neuronaux (76).

Dans des biopsies de néocortex de patients atteints de la MA, des études structurales et des marquages aux billes d'or ont révélé la présence d'une variété de vacuoles autophagiques en plus de lysosomes denses. Ces vacuoles autophagiques observées incluaient des

autophagosomes, des amphisomes, des corps multilamellaires et des autolysosomes. Les autophagosomes s'accumulaient dans les prolongements neuronaux (85, 86). Ces observations suggèrent que le flux autophagique est compromis dans la MA (76, 87, 88). Ainsi, les autophagosomes seraient dans l'incapacité de fusionner totalement avec les lysosomes. Ces théories se sont confirmées dans différentes études qui démontrent des défauts de protéolyse et des lacunes dans le transport autophagique. Une des machineries fondamentales de dégradation cellulaire est ainsi affectée dans la MA, contribuant ainsi à des dysfonctionnements neuronaux.

I.1.4.3 Perturbation des structures membranaires dans la maladie d'Alzheimer

De nombreuses structures membranaires sont perturbées dans la MA. Le fonctionnement et la dynamique des organelles comme les endosomes, les lysosomes, les mitochondries ou l'appareil de Golgi sont modifiés au cours de la pathologie. Nous présentons ces désordres dans cette section.

I.1.4.3.1 Perturbation de la voie endosomale et de la voie lysosomale

La voie endosomale et la voie lysosomale permettent aux neurones de dégrader, de recycler ou de véhiculer des molécules extracellulaires, par la fusion d'une série de vacuoles que sont les endosomes précoces ou tardifs, et les lysosomes contenant les enzymes de dégradation. Un dysfonctionnement de ces voies, observé dans la MA, précède et favorise l'apparition de la pathologie de tau et du peptide A β (89, 90).

La voie endosomale et lysosomale jouent un rôle important dans la pathophysiologie du précurseur du peptide amyloïde et dans la production du peptide A β (91–94). Ainsi, des perturbations dans ces voies stimulent la production du peptide A β ou affectent sa dégradation. Des endosomes précoces élargis sont décrits dans les neurones corticaux pyramidaux avant les dépôts de plaques amyloïdes dans la MA (90, 95). Il existe une augmentation du niveau d'expression des gènes régulant les endosomes précoces (rab5) et les endosomes tardifs (rab7) dans les neurones des patients présentant des troubles cognitifs légers et ceux présentant la MA (96, 97). L'enzyme lysosomale cathepsine D est aussi impliquée dans la pathogenèse, notamment avec les dépôts amyloïdes (98–101).

Des études récentes suggèrent que différentes étapes de la voie endosomale sont essentielles à l'autophagie (102). En effet, il existe des convergences de la voie autophagique et de la voie endosomale-lysosomale lors de la fusion et de l'adressage des vésicules. Des dysfonctionnements dans l'ensemble de ces voies contribuent donc à affecter le fonctionnement du neurone.

1.1.4.3.2 Dysfonctionnement mitochondrial : impact sur le métabolisme neuronal

Les mitochondries sont les organelles qui fournissent de l'énergie à la cellule grâce à la production d'ATP par la chaîne respiratoire. Lors du vieillissement, de nombreuses mutations se produisent dans l'ADN mitochondrial (103–109). L'hypoactivité neuronale observée pendant les stades avancés de la MA a mené plusieurs équipes à étudier l'implication des mitochondries dans ce phénomène (110). Des dysfonctionnements dans l'activité mitochondriale ont ainsi été démontrés en faveur de l'hypométabolisme observé dans les neurones corticaux chez les patients (111, 112). L'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale diminue significativement dans les tissus des patients atteints de la MA (113–116). Il existe aussi une interaction physique entre les mitochondries et le peptide A β (117).

Les NFTs ont été décrits comme contribuant au dysfonctionnement mitochondrial (118). La tau tronquée en position D-421 induit la fission mitochondriale alors que la tau pleine longueur augmente la taille des mitochondries (119, 120). Dans les souris transgéniques P301L; qui surexpriment la tau humaine portant la mutation faux-sens P301L dans l'exon 10, retrouvée dans les démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (FDTP-17), une équipe a montré des dysfonctionnements mitochondriaux grâce à des analyses fonctionnelles et protéomiques (121). Plusieurs groupes ont également montré que la protéine tau phosphorylée affecte le transport axonal antérograde des mitochondries (122, 123). De même, dans le modèle de souris P301L, il existe une importante diminution des mouvements des mitochondries (124). Alors que le peptide A β affecte le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, la protéine tau dérégule le complexe I (125).

La protéine tau et le peptide amyloïde contribuent au dysfonctionnement mitochondrial. Ainsi, le métabolisme énergétique cellulaire est déséquilibré et peut conduire à la neurodégénérescence et au dysfonctionnement neuronal.

1.1.4.3.3 Perturbation de l'appareil de Golgi : fragmentation dans la maladie d'Alzheimer

- *Le rôle physiologique de l'appareil de Golgi*

Le Golgi est une organelle composée d'un ensemble de saccules successifs empilés. De petites vésicules cargos y sont intégrées et en bourgeonnent en flux constant (126–129). Le Golgi assure des fonctions telles que : le transfert des protéines du réticulum endoplasmique aux vésicules de sécrétion, qui vont ensuite à la membrane plasmique ou fusionner avec d'autres vésicules; la maturation des protéines par modification post-traductionnelle; l'envoi de protéines à différentes destinations. Dans les neurones, le Golgi a un rôle clef dans le trafic des protéines endogènes et des macromolécules exogènes dans l'axone, régulés par le flux des transports antérogrades et rétrogrades. Pour assurer ses fonctions, le Golgi est une organelle hautement dynamique et sa morphologie change afin d'assurer les besoins cellulaires. Tout mauvais fonctionnement de l'appareil de Golgi cause donc des aberrations dans le fonctionnement neuronal et des pathologies puisque le trafic protéique cellulaire n'est plus correctement assuré (130). Quatre éléments maintiennent l'intégrité structurelle et fonctionnelle du Golgi : 1) les microtubules et les protéines associées aux microtubules, 2) les protéines associées au cytosquelette (glutubuline, kinésine, dynéine, contractine, myosine, spectrine, ankyrine, comitine), 3) les protéines matrices du golgi (giantin, GM130, golgin etc) et 4) les protéines qui assurent le ciblage et la fusion des vésicules de transport au bon compartiment (rabs, SNAREs etc) (131–133).

- *L'appareil de Golgi dans la maladie d'Alzheimer*

Dans plusieurs maladies neurodégénératives, dont la MA, on peut observer un appareil de Golgi fragmenté ou dispersé dans les neurones. Ainsi, dans les modèles de souris transgéniques pour la MA et les modèles cellulaires in vitro où la pathologie est induite, la fragmentation du Golgi est observée en parallèle à une atrophie neuronale reflétant un

désordre métabolique, et à l'accumulation de protéines mal conformées ou agrégées comme A β ou les NFTs (134).

La protéine APP est transportée du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique du neurone, en passant par l'appareil de Golgi (93). La protéine APP se localise majoritairement au Golgi, où elle subit les modifications post-traductionnelles (93). De nombreuses études ont démontré que l'appareil de Golgi est une organelle de production de l'A β en plus du réticulum endoplasmique et du système endosomal/lysosomal (135). Le peptide amyloïde possède aussi la propriété de fragmenter le Golgi (136, 137). Cette fragmentation entraîne alors l'augmentation de la production du peptide amyloïde dans une boucle rétroactive (137). Les enzymes qui clivent l'APP sont retrouvées également dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les vésicules de sécrétion (46, 138–151).

L'appareil de Golgi contribue donc à la pathologie amyloïde observée dans la MA (152).

L'appareil de Golgi joue aussi un rôle important dans l'organisation du réseau de microtubules. Une protéine comme GM130, par exemple, localisée aux membranes du Golgi module la formation des microtubules et donc le trafic cellulaire (153). Notre laboratoire a démontré que la protéine tau interagit avec les membranes de l'appareil de Golgi (154). Il a été également démontré, dans notre laboratoire, que la surexpression de la forme sauvage de tau ou des mutants de tau dont les mutations sont retrouvées dans les FDTP-17 comme P301L, V337M, ou R406W (mutations faux sens dans l'exon 10, 12 et 13 de tau respectivement) augmente la fragmentation du Golgi dans des cultures primaires de neurones de rats (155). Cette fragmentation du Golgi n'était pas associée à la mort cellulaire et le réticulum endoplasmique demeurait intact (155). La fragmentation du Golgi est un événement précoce précédant l'apparition des dépôts de NFTs. De même, notre laboratoire a précédemment observé la fragmentation du Golgi, dans le modèle *in vivo*, de souris JNPL3 exprimant la tau mutée P301L (155). Une équipe a également démontré que l'augmentation de la fragmentation du Golgi est corrélée avec l'augmentation de l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Ils suggèrent dans leur étude que la fragmentation de l'appareil de Golgi est en amont de l'hyperphosphorylation de tau et l'initie (156).

L'appareil de Golgi et son implication dans les voies de sécrétion joue un rôle important dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (136).

- Modulation de la structure de l'appareil de Golgi

La structure du Golgi est modulée par plusieurs facteurs comme l'activation de la cycline-dépendante kinase 5 (137), l'expression de rab1a (157) ou encore l'activité neuronale (158). Les protéines rabs sont de petites GTPases de la famille des Ras. Il existe environ 70 protéines rabs chez les mammifères. Environ 20 sont associées à l'appareil de Golgi (159). Parmi la vingtaine, seulement quelques rabs sont impliquées dans la structure du Golgi comme rab1, rab6, rab18, rab30, rab33, rab41, rab43. Rab1 a été démontrée comme étant la seule essentielle au trafic protéique du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique et est impliquée dans la structure du Golgi (160). L'utilisation d'ARN interférents pour rab1A inhibe fortement le trafic du réticulum endoplasmique au golgi et conduit à sa dispersion. Cette dispersion est neutralisée par l'expression de rab1A ou rab1B (161).

Les protéines GRASPs contribuent également à la structure de l'appareil de Golgi, notamment GRASP65 (162) et GRASP55 (163). De multiples mécanismes sont impliqués dans la fragmentation du Golgi et la modulation de la phosphorylation de ces protéines en est un. Cdk5 est une kinase qui phosphoryle les GRASPs lorsqu'elle est activée. Au niveau moléculaire, il a été démontré que l'accumulation de l'A β augmente le flux calcique qui induit l'activation de la calpaïne et initie le clivage de p35 en p25 (164, 165). P25 active alors Cdk5 qui phosphoryle GRASP65. Les GRASPs se détachent alors des saccules du Golgi, qui perd sa morphologie et se fragmente. Cette fragmentation peut être inversée par l'utilisation d'inhibiteurs de cdk5 ou par l'expression de GRASPs non phosphorylables (137).

Par ailleurs, les changements de taille du Golgi sont utilisés pour mesurer l'activité métabolique neuronale (166). Ainsi, plusieurs équipes ont démontré que les patients témoins (sans pathologie Alzheimer ou à des stades précoces) portant l'allèle apoE ϵ 4 présentent des appareils de Golgi plus petits que les patients témoins ne portant pas l'allèle. Certaines études révèlent également que lors de la progression de la pathologie à des stades plus avancés, la taille des Golgi diminuait de manière très importante. Cette observation reflète une

diminution du métabolisme neuronal (166, 167). Ces observations sur les changements du métabolisme neuronal, au cours de la pathologie, seront discutées dans la section suivante.

I.1.4.4 Perturbation de l'activité neuronale : hyperactivité précoce et hypoactivité tardive

Le déclin cognitif observé dans la MA s'accompagne d'une diminution de la transmission synaptique et de l'activité neuronale. Dans les stades avancés de la pathologie, le réseau neuronal est donc dit hypoactif. Les progrès en imageries et en physiologie des dernières années, ont permis de faire une nouvelle observation dans le cerveau des patients et dans les modèles animaux de la pathologie : à des stades précoces, les réseaux neuronaux sont hyperactifs et non hypoactifs (168–176). Cette découverte apporte une contribution majeure pour la compréhension du développement de la MA et des approches thérapeutiques potentielles à des stades précoces de la pathologie.

Dans le cerveau des patients Alzheimer, la combinaison de marqueurs calciques à l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, ainsi que l'analyse d'électro-encéphalogrammes ont permis d'analyser l'hyperactivité simultanée de populations de neurones aux stades précoces de la pathologie (135-143).

Dans les modèles de souris qui développent les plaques amyloïdes tel que les souris APP23xPS45, les neurones proches des dépôts amyloïdes sont hyperactifs chez les souris jeunes, mais hypoactifs chez les vieillissantes (168, 177, 178). Il reste à élucider si les plaques amyloïdes ou l'hyperactivité neuronale précèdent ou initient l'hypoactivité neuronale. Des études suggèrent que le phénomène d'hyperactivité est lié à la présence ou à l'accumulation de plaques amyloïdes et corrèle avec des déficits cognitifs dans les modèles animaux (179, 180). Ainsi, deux groupes ont montré que l'inhibition de l'hyperactivité neuronale préserve des pertes cognitives associées (179, 180). La limitation de la production du peptide amyloïde a également diminué l'hyperactivité neuronale observée (181). Plusieurs études ont montré que les plaques amyloïdes n'étaient pas nécessaires pour déclencher l'hyperactivité. Ainsi, chez les jeunes souris APP23xPS45 qui ne présentent pas de plaques amyloïdes, les chercheurs ont observé une hyperactivité neuronale très importante dans la région CA1 de l'hippocampe (181).

La pathologie de tau observée dans la maladie d'Alzheimer a pour cause plusieurs des évènements cellulaires décrits plus haut. Nous allons par la suite développer en détails la contribution de la protéine tau dans la MA avec les connaissances actuelles.

I.2. Protéine tau intracellulaire: du rôle physiologique à la pathologie

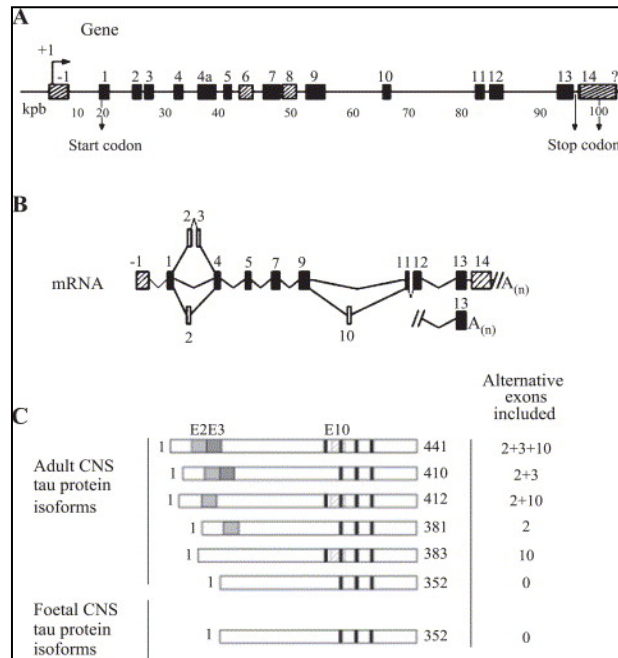
I.2.1 Structure, localisation, et fonctions de la protéine tau intracellulaire en conditions physiologiques

I.2.1.1 Gène et épissage alternatif de tau

Tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules ou MAP (Microtubule Associated Protein). Le gène MAPT codant pour la protéine tau se trouve sur le bras long du chromosome 17, en position 17q21 (182). Le gène MAPT est composé de 16 exons, cependant 3 d'entre eux (exon 4A, 6 et 8) ne sont jamais présents dans l'ARN messager humain dans le système nerveux central (182–189). Ce gène est principalement exprimé dans les cellules neuronales. Dans le système nerveux central, l'épissage alternatif de l'exon 2, 3 et 10 (183) est à l'origine des six isoformes de tau présentes dans le cerveau adulte : 2+3+10+, 2+3+10-, 2-3-10+, 2+3-10-, 2+3-10+, 2-3-10- (190–192). Les différentes isoformes sont exprimées inégalement durant le développement post-natal (190, 192–194). Ces différentes isoformes diffèrent par la présence de trois ou quatre domaines de liaison aux microtubules et correspondent à l'absence ou à la présence de l'exon 10 respectivement. Les domaines de liaisons aux microtubules sont répétés et similaires de 31 ou 32 acides aminés notés R1 à R4 (Figure3.) (188, 190, 193, 195).

Figure 3. Le gène et les isoformes de tau dans le système nerveux central

Schéma tiré de Sergeant et al, Biochimica et Biophysica Acta 2004.



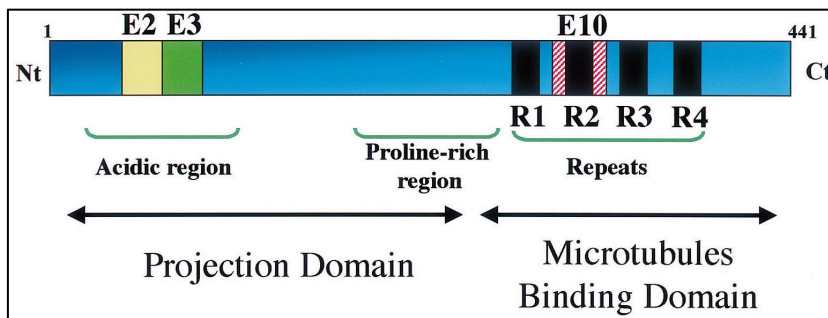
Le gène de tau est situé sur le chromosome 17. L'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 est à l'origine de 6 isoformes humaines dans le système nerveux central adulte.

1.2.1.2 Structure de tau

Les six isoformes de tau varient entre 352 à 441 acides aminés et leur masse moléculaire de 45 à 65 kDa (188). La protéine tau possède deux domaines fonctionnels. Le domaine amino-terminal est appelé domaine de projection. Ce domaine N-terminal est caractérisé par l'absence (0N) ou la présence de 1 ou 2 inserts (1N ou 2N), codés par les exons 2 et 3 (190, 194). Cette région de la protéine est très acide et est suivie par une région riche en proline basique (188). Le domaine carboxy-terminal ou domaine de liaison, contient les régions répétées R1 à R4 qui permettent la liaison aux microtubules.

Figure4. Structure de tau

Schéma tiré et adapté de Buée et al, *Brain Research Reviews* 2000.



Le domaine amino-terminal de tau correspond au domaine de projection. Le domaine carboxy-terminal comprend la région de liaison aux microtubules. Cette dernière est précédée par une région riche en prolines.

I.2.1.3 Localisation et fonction de tau

En condition physiologique, la protéine tau se localise principalement dans l'axone des neurones mais se retrouve également au niveau des dendrites, des membranes plasmiques et dans le noyau (69, 196–198). Selon sa localisation, la fonction de la protéine tau diffère, jouant ainsi de multiples rôles dans la cellule.

- Tau au cytosquelette et aux membranes

La fonction principale connue de la protéine tau est de promouvoir l'assemblage et de stabiliser les microtubules en liant les dimères de tubulines (199). En conséquence, elle est impliquée dans la morphogénèse, le développement axonal et le transport des protéines à l'axone (200–204). Les isoformes à quatre domaines de répétitions 4R lient et polymérisent plus efficacement les microtubules que les isoformes à trois domaines de répétitions 3R (188, 205–207). Grâce à leur domaine de liaison supplémentaire, les isoformes 4R ont une meilleure affinité pour les microtubules que les isoformes 3R (193). Plus précisément, il a été démontré que l'isoforme 4R a une plus grande affinité pour les microtubules grâce à une région se

trouvant entre les répétitions 1 et 2, et qui n'existe pas dans l'isoforme 3R (208). La modification post-traductionnelle la plus commune de tau est la phosphorylation. Des modifications dans l'état de phosphorylation de tau régule son activité. Ainsi, des études ont montré que la capacité de liaison aux microtubules de tau est régulée par sa phosphorylation (209, 210). Par exemple, la phosphorylation sur la thréonine 231 réduit fortement la liaison de tau aux microtubules (211). Des études ont montré que l'épissage alternatif de l'exon 10 est régulé indirectement par plusieurs protéines kinases incluant la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) (212, 213) et la protéine kinase A (PKA) (214). Nous mentionnons également que le réseau des microtubules organise la polarité neuronale. En effet, le neurone est une cellule polarisée puisqu'il possède deux compartiments structurellement et fonctionnellement différents : l'axone et le compartiment somato dendritique qui véhiculent l'information. Typiquement, un axone est un long prolongement neuronal qui transmet les signaux grâce au relargage de neurotransmetteurs. Les multiples dendrites permettent de recevoir l'information grâce à la présence de récepteurs pour recevoir le signal nerveux des autres neurones (215). Le maintien des différents compartiments est essentiel au développement et à la physiologie du système nerveux. Cette polarité neuronale est maintenue par l'organisation du cytosquelette, grâce à la dynamique de l'actine et des microtubules (216, 217). En stabilisant les microtubules, la protéine tau contribue donc au maintien de la polarité cellulaire. Plusieurs études ont montré que l'absence de tau affecte le réseau de microtubules et l'organisation de la polarité neuronale (218, 219).

La portion N-terminale se projette à partir de la surface des microtubules et peut interagir avec d'autres éléments du cytosquelette, ainsi que la membrane plasmique neuronale (220, 221). Le domaine amino-terminal de tau régule l'espace entre les microtubules, ce qui a pour conséquence de moduler le diamètre de l'axone (222). Tau peut donc ainsi organiser la morphologie cellulaire ou être un médiateur entre deux éléments cellulaires. La fonction de tau à la membrane plasmique n'est pas encore identifiée, mais il a été décrit que tau peut interagir avec des protéines à la membrane plasmique comme Fyn (223). Le rôle physiologique de ces interactions membranaires reste à identifier.

- *Tau au noyau*

La protéine tau est également localisée dans le noyau des neurones du cortex (224). Tau peut se lier à l'ADN (225, 226). Par translocation nucléaire, la protéine tau semble pouvoir protéger l'ADN de divers dommages produits par un stress thermique ou oxydatif (225–227). Les études *in vitro* fonctionnelles sur la localisation de tau au noyau ont été validées *in vivo* récemment (228, 229).

- *Tau lors du développement*

La fonction physiologique exacte de chaque isoforme reste également inconnue à ce jour. Toutes les isoformes ne sont pas exprimées en même temps au cours du développement. Par exemple, dans le cerveau humain adulte les isoformes 3R et 4R sont présentes en quantité égale. En revanche la forme 1N de ces deux types est présente en plus grande quantité. De plus, l'épissage alternatif de tau est régulé lors du développement, comme l'isoforme la plus courte 3R/0N qui est la seule exprimée dans le cerveau fœtal (190, 192). L'expression de cette isoforme durant le développement fœtal permet d'assurer un dynamisme des microtubules pour permettre la mise en place des connections nerveuses. La présence de l'isoforme 4R après la naissance contribuerait au maintien des structures neuronales établies avant la naissance (193).

I.2.1.4 Modification post-traductionnelle de tau la plus fréquente : la phosphorylation

La modification post-traductionnelle de tau la plus fréquente est la phosphorylation. La forme la plus longue de tau de 441 acides aminés contient 85 sites phosphorylables (230). La phosphorylation de tau est régulée principalement par la balance entre l'action des kinases et des phosphatases (209, 231).

De nombreuses kinases, plus d'une vingtaine, peuvent phosphoryler tau, *in vitro* et *in vivo*, sur les résidus sérine (Ser), thréonine (Thr) et tyrosine (Tyr) (230). Les sites suivis d'une proline, sont généralement phosphorylés par les kinases de la famille PDPK pour « proline-directed protein kinases » qui sont dirigées contre les motifs Ser-Pro et Thr-Pro (188). Ainsi GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase) ou cdk5 (Cyclin Dependante Kinase 5) sont des kinases de la famille PDPK qui phosphorylent tau (232–234). Les kinases non-PDKP vont phosphoryler les sites non suivis de proline (235) comme par exemple PKA (cAMP-dependent

protein kinase) ou la caséine kinase II (236–238). Fyn, membre de la famille des tyrosine kinase peut phosphoryler tau sur les tyrosines (239, 240).

La principale phosphatase impliquée dans la régulation de 70% de la déphosphorylation de tau dans le cerveau est PP2A (241–243). L'inhibition de PP2A régule la phosphorylation de tau directement et indirectement en activant GSK3 β (244). In vitro, les phosphatases PP1, PP2A, PP2B et PP5 sont également capables de déphosphoryler tau (245–250).

La phosphorylation de tau joue sur différentes fonctions physiologiques. Comme mentionné précédemment, la phosphorylation régule la dynamique de tau avec les microtubules. La phosphorylation de tau joue également un rôle lors du développement puisqu'il a été montré que la phosphorylation de tau est plus importante dans le système nerveux central embryonnaire (251, 252). Cette phosphorylation est requise pour le développement de prolongements neuronaux par exemple (253).

Au cours du développement de la MA, la structure, la localisation et les fonctions de la protéine tau sont dérégulés. Nous développerons ces aspects dans la section suivante.

I.2.2 Structure, localisation et fonctions de la protéine tau intracellulaire en conditions pathologiques

En conditions pathologiques, la protéine tau devient hyperphosphorylée. Elle perd alors son affinité pour les microtubules et se détache de ceux-ci. Ce détachement conduit à l'agrégation de tau en paires de filaments hélicoïdaux (PHF) (254) qui forment les NFTs (38, 255–257).

I.2.2.1 Gène et mutations de tau dans les démences

Les filaments insolubles composés de tau hyperphosphorylée sont aussi retrouvés dans un groupe de pathologies appelées les dégénérescences lobaires fronto-temporales (DLFT). Les DLFT représentent 5 à 15% de l'ensemble des démences, incluant la démence fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (FDTP-17) (255, 258, 259). L'identification des mutations dans le gène MAPT codant pour la protéine tau, chez les

patients souffrants de DLFT, soulève l'importance de tau dans les dysfonctionnements neuronaux (258, 260, 261). Au moins 40 mutations identifiées sont responsables de 10 à 20% des cas familiaux (259, 260, 262–264). Pour les FDTP-17, les mutations sont de type faux sens, délétions, silencieuses ou introniques. Elles sont localisées principalement au niveau des exons 1, 9, 10, 11, 12 et 13 de MAPT. Les mutations dans l'exon 9 (G272V), l'exon 12 (V377M) et l'exon 13 (R406W) affectent les six isoformes de tau. Les mutations dans l'exon 10 (N279K, ΔK280, P301L, P301S et S305N) affectent seulement les isoformes 4R de tau. Ces dernières ou les mutations dans les sites d'épissage de l'exon 10 (L282L, N296N) ont pour conséquence une modification du ratio 3R/4R. Les mutations faux sens sont localisées dans la région de liaison aux microtubules ou proches de cette région. Elles ont également pour conséquence une diminution de l'affinité de tau avec les microtubules, ainsi qu'une stimulation de l'activité de l'héparine contribuant à la formation de filaments de tau plus ou moins forte en fonction de la mutation (265, 266). Il existe ainsi deux groupes distincts de FDTP-17 selon le type de mutations et les effets fonctionnels subséquents induits (193). Le premier groupe regroupe les mutations qui affectent l'épissage alternatif de l'exon 10 et le deuxième, le groupe porteur des mutations affectant l'interaction de tau avec les microtubules (193).

Chez les patients atteints de la MA, aucune mutation dans le gène de tau n'a été identifiée à ce jour. Néanmoins, des études récentes ont révélé la possibilité que les polymorphismes dans le gène de tau pourraient être un facteur de risque pour la MA et les DLFT sporadiques (267, 268).

1.2.2.2 Phosphorylation de tau dans la maladie d'Alzheimer

Dans la MA, la protéine tau est hyperphosphorylée (188, 193, 255). C'est à dire que la quantité de groupes phosphates par molécule de tau est plus élevée. De plus, lors de la maladie, la phosphorylation peut se produire sur des sites qui ne sont pas phosphorylés en conditions physiologiques. Ceci est défini comme une phosphorylation anormale de la protéine tau. A l'aide de la spectrométrie de masse et de l'immunomarquage, plusieurs équipes ont démontré que la tau dans les PHFs peut être phosphorylée sur au moins 42 sites (235, 269–271). De très nombreux anticorps ont été développés pour détecter cette

hyperphosphorylation. Nous citons en exemple AT8 (272) ou AT100 (273), largement utilisés dans la littérature. Une accumulation de tau phosphorylée est nécessaire pour voir apparaître les NFTs (274).

Comme mentionné précédemment, la phosphorylation de tau est un équilibre entre l'activité des kinases et des phosphatases. Dans la MA, l'activité de ces régulateurs est compromise, et peut être associée à une augmentation de l'activité des kinases et une diminution de l'activité des phosphatases. Ainsi, il a été démontré que l'activité de la phosphatase PP2A est compromise dans le cerveau des patients atteints de la MA (275–277). L'activité de PP2A peut également être inhibée par deux protéines I1PP2A et I2PP2A . L'expression de ces derniers est augmentée dans la MA (278). In vitro, I2PP2A est associée à une hyperphosphorylation de tau (279, 280). Dans le cerveau des patients, des co-marquages révèlent que PP2A colocalise avec les inhibiteurs de PP2A et la tau anormalement hyperphosphorylée (278). L'inhibition de PP2A par I2PP2A, active également la kinase GSK3 , ce qui contribue à l'amplification de l'hyperphosphorylation de tau et à la complexité du phénomène. D'ailleurs pour ajouter à la complexité du phénomène, plusieurs kinases peuvent également conjointement phosphoryler tau (236, 281). Les kinases cdk5 et GSK3 β ont été particulièrement étudiés puisqu'elles phosphorylent la majorité des sites pathologiques (282). De nombreuses stratégies thérapeutiques développées contre tau ont ciblé la modulation de sa phosphorylation. Deux essais cliniques pour des inhibiteurs de kinases se sont soldés par des échecs en phase 2 récemment (283).

Les conséquences d'une phosphorylation anormale de tau sont une perturbation de la stabilité des microtubules et des déficits dans le transport axonal (284). Plusieurs études in vitro et in vivo ont également démontré que l'hyperphosphorylation de tau n'affecte pas la stabilité du réseau de microtubules (285).

Dans la MA, la protéine tau hyperphosphorylée a une localisation somato-dendritique (286).

L'implication de tau dans la neurodégénérescence est confirmée dans des lignées cellulaires et des modèles de souris surexprimant la forme sauvage ou mutée de la tau humaine (287–294). Plusieurs modèles développent la pathologie de tau, définie comme étant la

formation de filaments insolubles composés de protéine tau hyperphosphorylée dans le compartiment somato-dendritique. Lorsque la surexpression de tau est ciblée au cerveau, la présence de la tau hyperphosphorylée est corrélée au déficit de mémoire (287, 290, 292, 295). Lorsque celle-ci est ciblée à la moelle épinière, l'hyperphosphorylation de tau est corrélée aux problèmes moteurs. Tous ces modèles montrent qu'une hyperphosphorylation de tau est nuisible au fonctionnement neuronal.

I.2.2.3 Agrégats de tau dans la pathologie

L'hyperphosphorylation de tau contribue au repliement de la protéine sur elle-même et à la formation d'agrégats. Des anticorps comme MC1, AT100 ou Alz-50 sont capables de reconnaître la protéine tau agrégée (296–298). Le rôle précis des agrégats de tau intracellulaire dans la neurodégénérescence reste à être caractérisé. En effet, chez les patients atteints de la MA, le degré de démence et les troubles de mémoire corrént avec le nombre de NFTs dans le cerveau (66, 295, 299–301). Cependant, dans les modèles de souris, la formation des NFTs peut être dissociée de la perte et de la dysfonction synaptique, des déficits de mémoire et de la perte neuronale (293, 302). De même, la protéine tau hyperphosphorylée seule est suffisante pour induire une cytotoxicité durant le développement (303, 304). Nous mentionnons également que plusieurs lignées de souris transgéniques présentent de la neurodégénérescence en l'absence de formation de NFTs (288, 291). Ceci nous indique que les NFTs pourraient ne pas être la forme la plus toxique de tau (305–307).

D'autres modifications post-traductionnelles comme la troncation peuvent aussi entraîner l'agrégation de la protéine tau. Ainsi par exemple les tronctions de tau en D421 par l'action des caspases favorisent l'agrégation (308, 309).

Dans les modèles de souris, la perte de mémoire est corrélée à la présence d'oligomères de tau (306, 310). Des oligomères similaires sont aussi détectés chez les patients (307, 311, 312). Ils se forment avant l'apparition des NFTs (313). Les anticorps TOC1, T22 et TOMA sont capables de détecter les oligomères. De plus, l'addition d'oligomères de tau, sur des neurones en culture induit un effet neurotoxique. Cet effet n'est pas observé lors de l'addition de fibrilles de tau (307, 314). En conclusions, la présence d'oligomères intracellulaires et extracellulaires de tau pourrait contribuer aux dysfonctions neuronales et à la

mort des neurones dans le cerveau des patients atteints de la MA. Nous ajoutons également que le fractionnement de cerveaux de patients a révélé que 40% de la tau anormalement hyperphosphorylée correspond à des oligomères cytosoliques et non à des fibrilles (68, 315).

Cibler la conformation tridimensionnelle anormale de tau est devenue une stratégie thérapeutique. Ainsi, un inhibiteur de l'agrégation de tau, le leucomethylthionium ou LMTX (dérivé du bleu de méthylène) est actuellement en phase III d'essai clinique (316, 317).

I.3 Théorie de la propagation de la pathologie de tau et protéine tau extracellulaire : un nouvel aspect de la pathologie

I.3.1 Théorie de la propagation de la pathologie tau

En 1991, le Docteur Braak a démontré que les NFTs composés de la protéine tau agrégée se propageaient de manière prédictible dans la maladie d'Alzheimer (Figure 5.) (66). Les stades de Braak sont au nombre de six et sont classés en fonction de la progression des NFTs dans le cerveau. Le développement des NFTs dans les régions transentorhinale et entorhinale correspond aux stades I et II et corrèle cliniquement avec des déficits de mémoire pour des événements récents et une désorientation spatiale légère. A ces stades, on note peu d'impact sur les activités courantes de la vie et les fonctions cognitives générales sont préservées. La propagation des NFTs dans les régions limbiques et leurs présences dans l'hippocampe correspondent aux stades intermédiaires III et IV et corrèlent cliniquement avec des troubles du langage, une désorientation spatiale et temporelle, des problèmes de concentration et de compréhension. Aux stades finaux V et VI, les NFTs se localisent dans de très nombreuses parties du néocortex, comme dans les aires sensorielles, ainsi que dans les zones motrices. Les malades ont alors des difficultés à reconnaître des objets, et présentent également des déficits dans la perception et la motricité (66, 318–320).

Le mécanisme selon lequel les NFTs se propagent demeure inconnu. Depuis peu, un nouveau concept a émergé selon lequel, dans plusieurs maladies neurodégénératives dont la MA, la propagation de protéines mal conformées et agrégées résulterait d'une transmission intercellulaire (319–324). Cette transmission impliquerait que les NFTs se propagent, dans le cerveau, par la libération d'une protéine tau mal conformée par un neurone, suivie de son

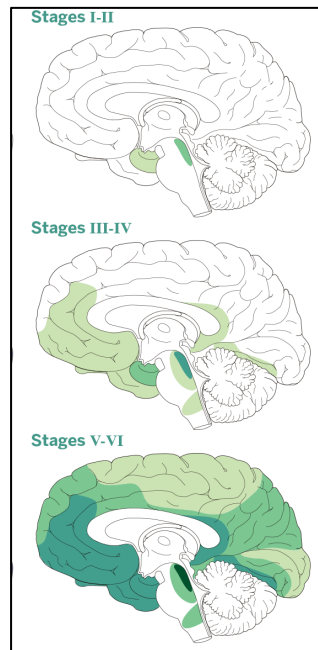
endocytose dans un neurone voisin. L'observation de la présence de la protéine tau dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) soutient ce concept (325–330). Plusieurs laboratoires et compagnies pharmaceutiques ont analysé les fragments de tau et la tau phosphorylée, présents dans le LCR, afin de développer de nouveaux biomarqueurs pour la MA (331–333). L'ensemble des résultats démontrent que la protéine tau augmente dans le liquide céphalo rachidien des patients atteints de la MA (271). La présence des isoformes 3R et 4R de tau a également été examinée dans le LCR des patients Alzheimer (334). Les isoformes 3R et 4R ont été trouvées dans le CSF des patients témoins et des patients affectés par la pathologie. Chez les patients atteints de la MA, il y avait une diminution des isoformes 4R, potentiellement expliquée par leur agrégation intracellulaire durant l'évolution de la pathologie. Ainsi, les isoformes 4R seraient moins disponibles pour être sécrétées. La caractérisation des formes de tau retrouvées et la phosphorylation de celles-ci dans le LCR demeurent cependant à éclaircir.

En 2009, des études soutenant la théorie sur la propagation de la pathologie apparaissent dans la littérature. Ainsi, plusieurs publications démontrent que la protéine tau peut être sécrétée, endocytée ou se propager, à la fois *in vitro* et *in vivo* (330, 335–346). Plus intéressant, dans les modèles de souris transgéniques où la surexpression de la protéine tau est restreinte au niveau du cortex entorhinal, la première région à être affectée dans la MA, la propagation de la pathologie de tau est observée le long des neurones connectés synaptiquement (347, 348).

Bien que les mécanismes de la propagation trans-synaptique restent à élucider, la sécrétion de tau par les neurones présynaptiques et son endocytose par les neurones postsynaptiques apparaît comme une hypothèse possible soutenant la théorie de la propagation de tau dans le cerveau.

Figure5. Propagation de la pathologie de tau dans la MA

Schéma tiré et adapté de Goedert et al, Science. 2015



Aux stades I et II de la pathologie, les NFTs se développent dans les régions entorhinale et transentorhinale . Aux stades III et IV, ils sont détectés dans la région limbique, dont l'hippocampe. Aux stades V et VI, ils se sont propagés à de nombreuses régions du néocortex.

I.3.2 La protéine tau extracellulaire en conditions pathologiques : un nouvel aspect de la propagation de la maladie d'Alzheimer

Depuis quelques années, les données générées in vitro et in vivo soutiennent que la tau extracellulaire peut être un facteur clef dans la pathologie de tau en favorisant la propagation de cette dernière dans le cerveau. Introduit précédemment, la présence de tau extracellulaire dans le cerveau des patients est détectable par son accumulation dans le LCR durant la progression de la pathologie (328). La détection par micro dialyse de la protéine tau dans le liquide interstitiel des souris tau transgéniques, en l'absence de toute neurodégénérescence, démontre que tau est sécrétée dans l'espace extracellulaire in vivo (340, 349). L'ensemble de

ces observations indique que la tau extracellulaire joue un rôle dans les dysfonctionnements neuronaux et la mort neuronale qui se produisent lors de la MA. La contribution de la protéine tau extracellulaire dans le processus de neurodégénérescence reste cependant à caractériser.

En 2010, une étude a démontré que la tau extracellulaire ajoutée au milieu de culture de cellules SH-SY5Y (350), se comportait comme un agoniste des récepteurs muscariniques M1 et M3, en induisant une augmentation soutenue du calcium intracellulaire et conduisant à la mort des cellules. La contribution de la tau extracellulaire à la mort neuronale via les récepteurs M1 et M3 reste à démontrer dans la MA. En 2012, il a été montré que les oligomères de tau, isolés de cerveaux Alzheimer, diminuaient la potentialisation à long terme (LTP) sur des coupes d'hippocampes de cerveaux (307). Cette équipe fut capable de neutraliser cette diminution en pré-incubant les oligomères de tau avec l'anticorps T22 qui reconnaît spécifiquement la forme oligomérique. Aussi, dans les cerveaux de souris transgéniques, cette LTP est affectée (351). Il reste à déterminer les mécanismes par lesquels la tau extracellulaire est impliquée dans ce phénomène.

La tau extracellulaire pourrait autant que la tau intracellulaire contribuer au processus de propagation de la pathologie de tau dans le cerveau. La propagation transcellulaire de la pathologie de tau est démontrée *in vitro* dans des cellules non-neuronales surexprimant la tau humaine (343). Plusieurs études ont révélé des données soutenant la contribution de la tau extracellulaire à la propagation de la pathologie *in vivo*. En 2009, pour la première fois, l'injection d'un homogénat de cerveau humain contenant la forme mutante P301S de tau a contribué à la propagation de la pathologie dans l'hippocampe et le cortex cérébral de souris transgénique surexprimant la tau humaine sauvage (335). Dans cette étude, il n'a pas été déterminé si cette forme mutante contribuait à la propagation en pénétrant dans les cellules ou en activant des mécanismes via la surface des neurones. Par ailleurs, le transfert de tau d'un neurone à un autre lors de l'injection de tau humaine dans les neurones centraux dans la lamproie indique également que la tau sécrétée peut être impliquée dans la propagation de la pathologie *in vivo* (338). En 2012, une équipe a surexprimé la tau humaine spécifiquement au cortex entorhinal d'une souris transgénique (347, 348). Une propagation trans-synaptique a alors été observée. La propagation trans-synaptique de la pathologie de tau est le résultat probable de la sécrétion présynaptique de tau et son endocytose postsynaptique dans le

neurone connecté (346). L'endocytose de tau extracellulaire dans le cerveau des souris fut prouvée pour la première fois en 2013. La tau extracellulaire peut contribuer à la pathologie par des mécanismes de surface, en l'absence d' endocytose. Ainsi, tau peut se lier aux récepteurs muscariniques (350). Dans ce cas , l'induction de calcium intracellulaire conduirait à l'augmentation de la tau hyperphosphorylée (350). Subséquemment, le pool de tau hyperphosphorylée pourrait séquestrer la tau normale et convertir toutes les isoformes en espèces pathologiques (352, 353).

I.3.3 Les modèles d'étude in vivo de la propagation de la pathologie de tau

Afin de comprendre la propagation hiérarchisée de la pathologie à travers les différentes régions du cerveau, différents modèles in vivo ont été créés ces dernières années.

Le système des neurones centraux de la lamproie a été le premier utilisé en 2009 pour étudier le transfert de tau d'un neurone à un autre. Étrangement, dans ce modèle, la partie N-terminale (1-255) de tau est nécessaire à la sécrétion et à la propagation. Cette observation n'a pas été décrite dans d'autres études. Cette équipe identifie également que la pleine longueur de tau est sécrétée par un mécanisme différent (338). Étant donné que personne d'autre n'a analysé la sécrétion de tau dans ce modèle, il est difficile d'apporter des conclusions permettant de faire le parallèle avec la pathologie.

En 2012, une équipe a généré une lignée de souris « rTgTauEC » qui exprime de manière réversible la protéine tau humaine mutée P301L restreinte dans la couche deux du cortex entorhinal (347). Selon les observations faites dans le cerveau des patients, cette couche est la première région où les agrégats de tau sont détectés. En laissant les souris vieillir, ils ont pu analyser la propagation de la protéine tau dans le cerveau et comparer les observations faites dans le cerveau des patients. Dans cette région, les neurones de la couche deux et trois du cortex entorhinal, projettent leurs afférences dans la couche intermédiaire moléculaire du gyrus denté et terminent la voie dans l'hippocampe (régions CA3 et CA1). Comme espéré, au cours du vieillissement des souris « rTgTauEC », tau se propage successivement de cellules en cellules dans les différentes régions connectées bien qu'elle soit seulement exprimée dans le cortex entorhinal. Cette tau est agrégée et hyperphosphorylée. Au cours du temps, cette équipe

a observé une dégénérescence synaptique puis axonale progressive, ainsi qu'une activation de la glie et la localisation pathologique de la protéine tau dans le soma des cellules. L'équipe conclut également que la transmission de la protéine tau se fait de cellules adjacentes à cellules adjacentes mais aussi par transmission synaptique. Autre point intéressant, la tau humaine mutée est capable d'agrèger la tau murine exprimée localement. Plus récemment, une autre équipe a également démontré que la protéine tau native non repliée peut se propager indéfiniment dans différentes lignées (354). En 2012, un autre laboratoire génère le modèle de la souris transgénique « NT », identique au modèle précédent (348). Cette équipe soutient également la théorie de propagation puisque l'expression de la tau restreinte au cortex entorhinal conduit à la propagation de la protéine par transmission synaptique au gyrus denté et à l'hippocampe, reproduisant également les stages précoces de Braak . Ce groupe détecte aussi une forme agrégée de tau tardivement.

Nous citons aussi une étude récente qui démontre que la déplétion de la microglie et l'inhibition de la synthèse des exosomes inhibent la propagation de tau dans les souris AAV1-P301L. Ce modèle fournit donc des arguments en faveur d'une transmission alternative non trans-synaptique de la protéine tau (355).

Les modèles murins où l'on observe la propagation de la pathologie de tau s'avèrent donc des modèles précieux pour développer des stratégies thérapeutiques adaptées. Nous mentionnons cependant que plusieurs modèles de propagation utilisent des formes mutées de tau. Or, dans la MA, il n'y a pas de mutations dans le gène de tau. De plus, l'agrégation des protéines de tau mutées, peut ralentir le processus de propagation de la pathologie. Les observations tirées de ces modèles pathologiques, peuvent donc différer des événements qui se produisent dans le cerveau des patients atteints de la MA. Pour répondre à ce point, une équipe a démontré pour la première fois en 2014, à l'aide de lentivirus, que la protéine tau sauvage humaine peut également se transférer de manière trans-synaptique in vivo dans des neurones de rats (356). De plus ils ont démontré qu'en effet, la tau mutée P301L se propage moins loin dans les projections que la tau sauvage humaine (356).

I.3.4 L'endocytose de tau

Les mécanismes impliqués dans l'endocytose de tau sont mal connus. L'agrégation, la forme tronquée de tau contenant le domaine de liaison aux microtubules ou encore la pleine longueur de tau favorisent son endocytose par les cellules neuronales et les cellules non-neuronales (336, 339, 346). La taille des fibrilles de tau influence la quantité de tau endocytée. Ainsi, les agrégats de faible poids moléculaire et les fibrilles courts mais pas les fibrilles longs sont endocytés par les neurones et les cellules Hela (346). Une autre étude récente a démontré, *in vitro*, que ce sont les espèces rares de tau solubles phosphorylées et de hauts poids moléculaires qui sont endocytées. Ces dernières sont ensuite transportées dans l'axone pour se retrouver dans le neurone connecté synaptiquement (357). Les agrégats de tau ne rentrent pas dans les cellules par des mécanismes passifs d'endocytose mais plutôt par un processus actif (336, 339, 346). La tau endocytée colocalise avec le dextran et la rab5, qui sont respectivement, un marqueur de vésicules d'endocytose et un marqueur de compartiment endolysosomal (346). L'endocytose de tau peut aussi avoir lieu grâce à la formation de macropinosomes, seul mécanisme clairement identifié à ce jour (324, 358). La macropinocytose est impliquée dans la formation de larges vésicules intracellulaires. Ce processus est initié par la liaison des agrégats de tau aux HSPGs (heparan sulfate proteoglycans) à la surface cellulaire. Les monomères de tau ne sont pas internalisés bien qu'ils se lient aux HSPGS. Seules les espèces agrégées sont endocytées par ce mécanisme (359). La même équipe a démontré que les trimères de tau sont l'unité minimale d'endocytose spontanée qui initie l'agrégation intracellulaire (360). En contradiction avec ces données, une équipe a démontré en 2009 que les monomères sont endocytés en très faible quantité dans les cellules C17.2 murines (336).

En 2012, il a été montré que l'endocytose des agrégats de tau peut être bloquée par l'addition de l'anticorps HJ9.3, capable de séquestrer la protéine tau dans le milieu (343). Cette étude met en évidence le fait que la propagation de tau peut être prévenue par l'utilisation d'anticorps anti-tau *in vivo*. D'autres laboratoires se sont lancés dans l'étude de l'immunothérapie pour déterminer quelle stratégie d'immunisation active ou passive fonctionnerait le mieux. Ils proposent par exemple d'explorer la clairance de tau par activation de la microglie ou de bloquer directement l'endocytose tout en soulevant la nécessité du

ciblage spécifique (361). Des tests cliniques sur la séquestration de tau sont actuellement en cours. Les résultats de ces tests devraient être publiés dans un futur proche.

I.3.5 La sécrétion de tau in vitro et sa caractérisation : les données de 2010 à avril 2012, précédant notre première publication de doctorat

Plusieurs équipes ont soutenu pendant longtemps que la tau détectée dans l'espace extracellulaire provenait du contenu cytoplasmique relargué lors de la mort neuronale. Cependant, la présence de tau dans le liquide interstitiel des souris transgéniques, ainsi que la présence de tau dans leur LCR, avant la neurodégénérescence, indique que la tau extracellulaire peut être relarguée par un processus actif de sécrétion in vivo (340, 349). De plus, plusieurs études s'efforcent de démontrer la sécrétion active de tau dans les modèles cellulaires, en dehors de toute mort neuronale, en utilisant des contrôles de dommages cellulaires. Le test du lactate déshydrogénase ou LDH est le test utilisé communément pour contrôler l'intégrité membranaire. Lorsque l'intégrité membranaire d'une cellule est affectée, le LDH, enzyme habituellement intracellulaire, se retrouve dans le milieu des cellules. Ainsi, le niveau de tau est comparé au niveau de LDH pour conclure que la protéine tau détectée n'est pas imputable à une perméabilité membranaire.

De 2010 à avril 2012, il a été démontré in vitro que la tau humaine surexprimée est sécrétée par les lignées cellulaires non-neuronales ou dérivées de neurones suivantes: HEK293T, COS7, M1C, NB2a/d1 (330, 337, 338, 345, 362). Les études dans les cellules M1C et NB2a/d1 ont rapporté que la tau sécrétée était clivée dans sa partie C-terminale (337, 338). Trois études ont démontré que la tau sécrétée était à la fois libre dans le milieu et également associée à des microvésicules/exosomes (330, 345, 362). Aucune autre caractérisation de la protéine tau sécrétée, comme la phosphorylation, n'a été effectuée avant avril 2012.

I.3.6 Les voies de sécrétion de la protéine tau extracellulaire : évidences pour les voies non conventionnelles

La plupart des protéines sécrétées possèdent un signal peptidique signal qui les cible au réticulum endoplasmique (RE) où les protéines sont ensuite transportées vers l'espace extracellulaire ou vers la membrane plasmique à travers la lumière du système de sécrétion

RE-Golgi (363). Les protéines possédant ce peptide signal utilisent les vésicules mantelées COP-II pour sortir du RE. La protéine tau est une protéine cytosolique dépourvue de ce signal. Cependant, l'absence de ce peptide signal n'exclut pas la possibilité pour une protéine d'être sécrétée. Durant la dernière décennie, la sécrétion de plusieurs protéines dépourvues de ce signal a été démontrée dans des voies de sécrétion non conventionnelles (364) (Figure6.).

Entre 2010 et 2012, la voie non conventionnelle analysée, empruntée par tau, est la voie exosomale . Dans les cellules M1C et COS-7 la tau surexprimée est relarguée via des exosomes et microvésicules (330, 345). Dans les HEK293, la forme 3R0N est à la fois sécrétée dans un groupe libre et un groupe associé aux microvésicules (345). Par ailleurs, dans le liquide céphalo-rachidien de patients contrôles et de patients Alzheimer, tau a aussi été retrouvée associée aux exosomes purifiés (330, 345, 362). Il existe deux catégories de tau dans les cellules : un groupe de tau localisé dans le cytosol et un groupe de tau associé à la membrane cellulaire (154, 365). Les deux groupes de tau sont susceptibles d'être sécrétés par les exosomes. Les protéines de tau cytosoliques seraient capturées à partir du cytoplasme durant la formation de vésicules endosomales internes, puis conduisent à la génération de corps multi-vésiculaires (MVB) qui peuvent fusionner à la membrane plasmique et générer le relargage des vésicules de type exosomes (voie1, Figure6.). Le groupe membranaire de tau est préférentiellement associé aux membranes du RE dans les souris JNPL3 et dans les cerveaux humains (365). Les membranes du RE sont un élément central de la voie de sécrétion conventionnelle mais peuvent aussi être impliquées dans la sécrétion non conventionnelle via les exosomes (364). Ainsi les vésicules COP-II formées à partir du RE peuvent évoluer en MVBs puis être sécrétées par les exosomes (voie 6, Figure6.) (366). Ceci précise donc que la tau attachée aux membranes du RE peut être sécrétée par la voie des exosomes. Dans le modèle de la lamproie, tau est trouvée dans des vésicules positives pour le marqueur LC3 (367). Précédemment, il a été montré que les autophagosomes peuvent fusionner avec les endosomes /MVBs pour sécréter les protéines par les exosomes (368). Les exosomes ne semblent cependant pas être la seule voie de sécrétion de tau puisque tau est également libre dans le milieu.

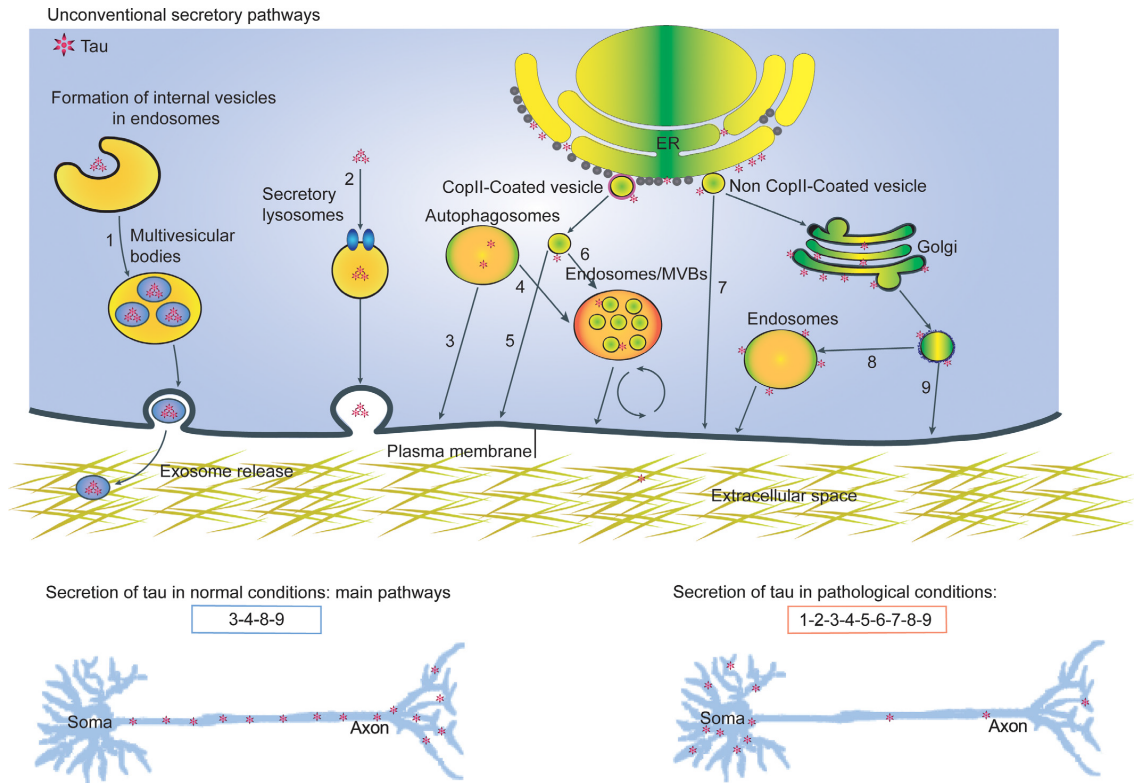
Une autre hypothèse, est que la tau peut être sécrétée par des lysosomes sécrétoires qui sont des organelles intermédiaires entre les lysosomes et les granules sécrétrices (voie2,

Figure6.) (369). Aucune étude n'a étudié la contribution des lysosomes sécrétoires à la sécrétion de tau. Dans le cas de la tau membranaire, elle peut être sécrétée grâce à son association avec les membranes du RE grâce au bourgeonnement de vésicules à leur surface. Par exemple, les vésicules COPII bourgeonnent à partir du RE et transportent la protéine tau depuis leurs surfaces. Ces vésicules peuvent alors directement fusionner avec la membrane plasmique pour la sécrétion (voie5, Figure6.) (370). Plusieurs schémas similaires pourraient se produire pour des vésicules non COPII qui se formeraient à la surface du RE et fusionneraient directement avec la membrane plasmique (voie7, Figure6.) (371), ou qui pourraient être envoyées à l'appareil de Golgi et être sécrétées par les compartiments endosomaux (voie8, Figure6.) ou encore par la voie des vésicules clathrines coatées (voie 9, Figure6.) (372, 373). Notre laboratoire a démontré que la protéine tau, détectée à la surface du Golgi, s'y localise en condition normale mais également en condition pathologique. Les vésicules issues de l'appareil de Golgi peuvent être impliquées dans la sécrétion de tau selon différentes possibilités. Les vésicules clathrines coatées issues du Golgi peuvent soit fusionner directement avec la membrane plasmique ou fusionner avec les endosomes/MVBs avant d'atteindre la membrane plasmique. Si les vésicules ont pour origine l'appareil de Golgi ou le RE, la protéine tau serait probablement attachée à la surface de ces vésicules et non localisée à l'intérieur. En effet, la protéine serait retrouvée sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique constituant la vésicule. On ne pourrait cependant pas exclure que la tau pourrait se retrouver à l'intérieur des vésicules par des phénomènes de type flip-flop rapportés au niveau des lipides membranaires. D'ailleurs la tau identifiée dans les ectosomes a été identifiée comme étant intra-vésiculaire par l'équipe de recherche (374). Les mécanismes par lesquels la protéine tau se retrouve à l'intérieur des vésicules restent toutefois à éclaircir.

Nous avons exploré ces différents voies non conventionnelles de sécrétion durant notre thèse. Les résultats de cette investigation suivront dans la section des articles publiés ou soumis.

Figure6. Les voies de sécrétions non conventionnelles de la protéine tau

Schéma tiré de N-V.MOHAMED et al, *European Journal of Neuroscience* 2013



Les voies de sécrétion non conventionnelles potentielles impliquées dans la sécrétion de tau. Tau est représentée par une étoile rouge. Dans la voie 1) la tau libre cytosolique pourrait être séquestrée dans des vésicules à l'intérieur des endosomes. Ces derniers pourraient mûrir en corps multivésiculaires (MVBs). Les MVBs fusionneraient avec la membrane plasmique pour relarguer les exosomes contenant tau. Dans la voie 2) la tau libre cytosolique pourrait être capturée par les lysosomes sécrétoires, qui fusionneraient avec la membrane plasmique pour relarguer la tau libre. Dans la voie 3) la protéine tau contenue dans les autophagosomes serait relarguée dans l'espace extracellulaire par leurs fusions avec la membrane plasmique. Dans la voie 4) les autophagosomes contenant tau fusionneraient avec les endosomes/MVBs avant de fusionner avec la membrane plasmique. Dans la voie 5) tau serait sécrétée par les vésicules mantelées COP-II formées au niveau du réticulum endoplasmique (ER) qui fusionneraient avec la membrane plasmique. Dans la voie 6) les vésicules mantelées COP-II formées au réticulum endoplasmique fusionneraient avec les endosomes/MVBs avant d'atteindre la membrane plasmique. Dans la voie 7) les vésicules non COP-II mantelées formées au réticulum endoplasmique atteindraient directement la membrane plasmique pour sécréter tau. Dans la voie 8), les vésicules non COP-II mantelées formées au réticulum seraient transportées au Golgi où les vésicules mantelées clathrines se formeraient et fusionneraient avec les endosomes. Ces derniers fusionneraient alors avec la membrane plasmique pour relarguer tau. Dans la voie 9) les clathrines mantelées formées au Golgi, qui contiennent tau, fusionneraient directement avec la membrane plasmique pour relarguer tau.

En conditions normales, tau est enrichie dans l'axone des neurones et peut être sécrétée par les voies 3,4,8 et 9. En conditions pathologiques, tau est enrichie dans le compartiment somato-dendritique et l'ensemble des voies non conventionnelles présentées peut contribuer à la sécrétion de tau.

I.4 Hypothèse, Objectifs de travail et Introduction de l' étude

A la lumière des publications scientifiques, la propagation de la pathologie de tau dans le cerveau a lieu de manière prédictible.

- Hypothèse :

Dans notre laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que la propagation de la protéine tau se faisait par un mécanisme de sécrétion par un neurone, suivi de son endocytose par un neurone adjacent, indépendamment de la mort neuronale. Les mécanismes cellulaires qui stimulent la sécrétion restent à identifier. Durant mon doctorat, j'ai émis l'hypothèse qu'il existe une sécrétion active de tau, et des mécanismes cellulaires spécifiques permettant de la moduler.

- Objectif de travail :

L' objectif de mon doctorat est d'étudier la sécrétion de la protéine tau. Ainsi, les trois objectifs de mon travail sont les suivants : 1) prouver l'existence de la sécrétion active de tau, 2) déterminer si des agressions cellulaires favorisent la sécrétion de tau, et 3) identifier des voies et des mécanismes cellulaires qui régulent la sécrétion de la protéine tau.

- Introduction de l'étude :

Pour étudier la sécrétion de la protéine tau, j'ai utilisé des modèles in vitro cellulaires de type Hela et neurones murins. J'ai tout d'abord démontré l'existence d'un phénomène actif de sécrétion dans ces modèles. Puis, j'ai prouvé que des insultes observées précocement ou tardivement dans la pathologie comme une hyperexcitabilité des neurones, une suractivation de l'autophagie, une augmentation de l'activité caspase ou une hyperphosphorylation de tau favorisent sa sécrétion. Enfin, j'ai identifié et modulé, des organelles et des mécanismes clefs, dans la régulation de cette sécrétion tels l'appareil de Golgi, l'activité de cdk5 et l'expression de rab1A.

Mon doctorat a donc contribué à apporter de nouvelles connaissances et à proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour ralentir la propagation de la pathologie de tau en ciblant sa sécrétion.

I.5 Contribution aux travaux

Dans notre première étude « Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion », publiée en 2012 dans PlosOne, nous sommes co-première auteure avec V. Plouffe. Les auteurs suivants sont : J. Rivest-McGraw, J. Bertrand, M. Lauzon et N. Leclerc. La conception et le design des expériences ont été produits par N. Leclerc, V. Plouffe et moi-même. Les résultats de la figure 1 ont été produits par V. Plouffe. Les résultats de la figure 2 ont été produits par V. Plouffe et J. Bertrand. Les résultats de la figure 3 et 4 ont été produits par V. Plouffe et moi-même. Les résultats de la figure 5 ont été produits par moi-même, J. Bertrand et J. Rivest-McGraw. Les résultats de la figure 6 ont été produits par moi-même et V. Plouffe. La figure 7 a été élaborée par moi-même et V. Plouffe. V. Plouffe, N. Leclerc, et moi-même, avons analysé les résultats de l'ensemble des figures. M. Lauzon a analysé la densitométrie des Western Blots de la figure 6. N. Leclerc, V. Plouffe et moi-même avons écrit et révisé la publication.

Dans notre seconde étude, « Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons » publiée en 2014 dans Scientific Reports, nous sommes première auteure. Les auteurs suivants sont : V. Plouffe, G. Rémillard-Labrosse, E. Planel et N. Leclerc. N. Leclerc, et moi-même avons contribué à la conception et au design des expériences. J'ai produit et été impliquée de l'ensemble des résultats des figures 1 à 5. V. Plouffe a produit des immunoprécipitations pour les figures 1 et 4. G. Rémillard-Labrosse a procédé à l'analyse morphologique présentée dans la figure 2b et 2c. N. Leclerc et moi-même avons analysé les résultats, et écrit le manuscrit. V. Plouffe et G. Rémillard-Labrosse ont participé à l'analyse de la figure 5A. E. Planel a été impliqué dans l'expérience de déphosphorylation de la figure 5. La totalité des auteurs a révisé le manuscrit.

Dans notre dernière étude doctorale «Golgi fragmentation increases tau secretion », soumis dans The Journal of Neuroscience au mois d'avril 2016, nous sommes première auteure. N. Leclerc est l'autre auteure de ce manuscrit. Nous avons conjointement conçu et désigné les expériences. L'intégralité des résultats a été produit par moi-même. L'analyse des résultats, et l'écriture du manuscrit s'est faite conjointement entre N. Leclerc et moi-même.

II. Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion

N-V. MOHAMED, V. PLOUFFE et al, Plos One 2012

Author Contributions

Conceived and designed the experiments : NL VP* N-VM*. Performed the experiments : VP* N-VM* JR-M JB. Analyzed the data : VP* N-VM* ML NL. Wrote the paper : VP* N-VM* NL.

* These authors contributed equally to this work

Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion

Vanessa Plouffe^{*}, Nguyen-Vi Mohamed^{*}, Jessica Rivest-McGraw, Johanne Bertrand, Michel Lauzon, Nicole Leclerc^{*}

Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract

It is well established that tau pathology propagates in a predictable manner in Alzheimer's disease (AD). Moreover, tau accumulates in the cerebrospinal fluid (CSF) of AD's patients. The mechanisms underlying the propagation of tau pathology and its accumulation in the CSF remain to be elucidated. Recent studies have reported that human tau was secreted by neurons and non-neuronal cells when it was overexpressed indicating that tau secretion could contribute to the spreading of tau pathology in the brain and could lead to its accumulation in the CSF. In the present study, we showed that the overexpression of human tau resulted in its secretion by Hela cells. The main form of tau secreted by these cells was cleaved at the C-terminal. Surprisingly, secreted tau was dephosphorylated at several sites in comparison to intracellular tau which presented a strong immunoreactivity to all phospho-dependent antibodies tested. Our data also revealed that phosphorylation and cleavage of tau favored its secretion by Hela cells. Indeed, the mimicking of phosphorylation at 12 sites known to be phosphorylated in AD enhanced tau secretion. A mutant form of tau truncated at D421, the preferential cleavage site of caspase-3, was also significantly more secreted than wild-type tau. Taken together, our results indicate that hyperphosphorylation and cleavage of tau by favoring its secretion could contribute to the propagation of tau pathology in the brain and its accumulation in the CSF.

Citation : Plouffe V, Mohamed N-V, Rivest-McGraw J, Bertrand J, Lauzon M, et al. (2012) Hyperphosphorylation and Cleavage at D421 Enhance Tau Secretion. PLoS ONE 7(5): e36873. Doi :10.1371/journal.pone.0036873

Editor : Mark R. Cookson, National Institutes of Health, United States of America

Received January 20, 2012; **Accepted** April 9, 2012; **Published** May 15, 2012

Copyright : © 2012 Plouffe et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding : This work was supported by Canadian Institute of Health Research (MOP-114874) (N.L.), Natural Sciences and Engineering Research of Canada (N.L.), the Alzheimer Society of Canada (N.L.) and an FRSQ infrastructure grant to the Groupe de Recherche sur le système nerveux central (GRSNC) (N.L.). V.P. has a studentship from GRSNC, J.B. has a post-doctoral fellowship from the Alzheimer Society of Canada and J.R.-M. obtained a summer studentship from NSERC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests : The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail :

* These authors contributed equally to this work

Introduction

The microtubule-associated protein tau that is normally enriched in the axon becomes hyperphosphorylated and accumulates in the somato-dendritic compartment in several neurodegenerative diseases named tauopathies that are characterized by dementia [1,2]. In these diseases that include AD, tau aggregates in insoluble filaments that form lesions called neurofibrillary tangles (NFTs) [3]. The appearance of these lesions in a predictable manner in the brain correlates with the degree of cognitive deficits [4,5,6,7]. Moreover, the amount of tau found in CSF increases during progression of AD [8]. It remains unclear how tau pathology propagates in the brain and how tau reaches the CSF. Recent studies have reported that the secretion of tau could contribute to both of these events. *In vitro*, tau was shown to be secreted by M1C, NB2a/d1, COS-7 and HEK-293 cells [9,10,11]. When human tau cDNA was microinjected in central lamprey neurons, human tau could transfer from one neuron to another indicating that secreted tau could be involved in the propagation of the disease *in vivo* [10]. However, it was unclear whether this phenomenon was specific to this model until two recent studies demonstrating the trans-synaptic propagation of tau pathology in a mouse model [12,13]. In this model, where human tau overexpression was restricted in the entorhinal cortex, the first region to be affected in AD, the spreading of tau pathology was observed along synaptically connected circuits. From these studies, one can conclude that the secretion of tau at the synapse might be involved in the propagation of tau pathology in mouse brain. Tau secretion could also result in the increase of tau in the CSF as reported in a study showing that the increased amount of tau in the CSF could not be linked to neurodegeneration in tau transgenic mouse models [14].

In AD, tau is phosphorylated at more than 40 sites compared to 9 sites in normal patients [15]. Until now, only few phosphorylation sites were examined in CSF. In several studies, both the amount of total tau and phosphorylated tau (ptau) were measured in the CSF [8]. Indeed, the ratio of ptau/total tau was shown to be more accurate in distinguishing Alzheimer's patients from controls than the mere measure of total tau. The phosphorylation of threonine 181 (T181) is extensively used for measuring

tau in the CSF [8]. In AD and in mildly cognitive impaired patients, the phosphorylation of T181 is significantly higher than in normal patients whereas it is decreased in patients presenting a fronto-temporal dementia (FTD) [16,17]. Moreover, phosphorylation of T181 was used to differentiate AD from dementia with Lewy bodies (DLB) [18]. The phosphorylation of T231 was also increased in CSF tau obtained from AD patients [19,20,21,22,23]. However, some studies reported that the phosphorylation of T231 decreased with the progression of AD [24]. The phosphorylation of T231 is lower in FTD than in AD [18]. The above observations revealed that the distinct pattern of tau phosphorylation could be used to discriminate between tauopathies. The phosphorylation of other sites such as S199, S202 and T205 (epitope recognized by the phospho-tau antibody AT8) and S396 and S404 (epitope recognized by the phospho-tau antibody PHF-1) were less examined and their phosphorylation in CSF remains controversial [25]. The low amount of tau in the CSF has been a limiting factor in characterizing its phosphorylation state. So far, the increase of tau in the CSF was attributed to neuronal cell death. A recent study reported that intracellular tau released in the culture medium upon cell death was dephosphorylated [26]. It remains to be determined whether tau found in the CSF has a phosphorylation pattern similar to that of intraneuronal tau.

Tau found in the CSF of AD and progressive supranuclear palsy (PSP) patients is cleaved [27,28,29]. The main cleavage seems to occur at the C-terminal. It is still unclear whether tau is cleaved before it is released in the CSF. A study reported that when full-length tau was added to the CSF, it did not get cleaved indicating that the cleavage of tau took place before its release in the CSF [27]. Interestingly, CSF-tau obtained from tau transgenic mice was also cleaved at the C-terminal [14]. A recent study reported that tau secreted by M1C and NB2a/d1 cell lines was cleaved at the C-terminal in a pattern reminiscent to tau found in the CSF [9,30]. All together, the above observations revealed that tau cleaved at the C-terminal is preferentially released in the CSF.

Until now, no study has examined whether phosphorylation and cleavage of tau favor its secretion. In the present study, we showed that the overexpression of human tau resulted in its secretion by Hela cells. Interestingly, secreted tau was dephosphorylated at several sites in comparison to intracellular tau and that only tau cleaved at the C-terminal was found in the medium. Our data also revealed that hyperphosphorylation and

cleavage of tau favored its secretion by Hela cells. Therefore, hyperphosphorylation and cleavage enhancing the secretion of tau in AD brain could contribute to the propagation of its pathology in the brain and to its accumulation in the CSF. From the present results showing that secreted tau was dephosphorylated and the previous study reporting that tau released in the culture medium upon cell death was dephosphorylated, one can also speculate that tau found in the CSF would be dephosphorylated.

Materials and Methods

Cell Culture and Transfection

Hela cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in DMEM (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% foetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) and 2 mM L- glutamine (Sigma, Oakville, ON, Canada) at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. For transfection, Hela cells were plated at a density of 1.1×10^6 cells in 60-mm Petri dishes and grown overnight to 80% confluency. Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used to transfect Hela cells with the expression vector (pEGFP-C1 from Clontech) containing either wild-type human 4R tau (wild- type htau) or human 4R tau mutant fused at the C-terminus of a Green Fluorescent Protein (GFP) tag or with the pRc/CMV vector containing wild-type human tau fused at the C-terminus of a Flag tag (kindly provided by Dr. Gloria Lee, University of Iowa, Iowa, IA). Briefly, for each petri, 8 µg of plasmid DNA was mixed with 500 µl of Opti-MEM medium (Invitrogen), and 16 µl of Lipofectamine2000 was mixed with 500 µl of Opti-MEM medium. Both mixtures were incubated for 5 min then mixed and left standing for 20 min. Then, 1 ml of the mixture was added to each petri. After an incubation of 4 hrs at 37°C, culture medium was replaced by 6 ml of fresh medium. The GFP-4Rtau construct was kindly provided by Dr. Ken Kosik (University of California, Santa Barbara, CA, USA; Lu and Kosik 2001), human 4R tau mutants, A12 and E12, containing 12 phosphorylation sites (S199, S202, T205, S214, T231, S235, S262, S356, S396, S400, S404 and S409) mutated in alanine and glutamate respectively, were modified from the GFP-4Rtau construct in our laboratory and tau Δ 413–441 and tau Δ 422–441 were generated from GFP- 4Rtau construct by Mutagenex (Piscataway, NJ, USA). Two days after transfection or as mentioned in the text, culture medium was harvested and cells were lysed for

immunoblotting.

Preparation of Cell Lysate and Culture Medium Containing Tau

Two days after transfection, the culture medium was collected and centrifuged at 3000 RPM for 10 min at room temperature to remove cell debris. After the culture medium was collected, the cells were immediately washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and once with PBS containing 0.5M NaCl to detach proteins non-specifically attached at the cell surface [31]. The cells were then lysed in 6 ml of fresh culture medium supplemented with 0.1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail 1X (Complete EDTA-free from Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and then incubated on ice for 10 min. The cell lysate was vortexed and then centrifuged at 3000 RPM for 10 min at room temperature.

Isolation of Microvesicles/exosomes

Two days after transfection, the culture medium was collected. The isolation of microvesicles/exosomes was performed using differential centrifugation as described by They et al. [32]. Briefly, the culture medium was centrifuged at 300xg for 10 min, then at 2000xg for 10 min and at 10,000xg for 30 min at 4°C to remove cell debris. The microvesicles/exosomes were isolated by a centrifugation at 100,000xg for 120 min at 4°C. Microvesicles/ exosomes were washed in PBS and centrifuged again at 100,000xg for 60 min at 4°C. The presence of tau in the pellet containing the microvesicles/exosomes was analyzed by western blotting.

Immunoprecipitation

To analyze the phosphorylation pattern of secreted tau, tau was immunoprecipitated from the culture medium and the cell lysate. Magnetic beads coupled with anti-mouse antibodies (DYNAL Biotech, DynabeadsH M-280 Sheep anti-Mouse IgG) were washed in PBS and incubated O/N at 4°C with the following antibodies: 0.3 µg Tau-1, 0.1 µg HT7 and 6 µl CP13 (kindly provided by Dr. Peter Davies, Albert Einstein University, Bronx, NY, USA). The beads were then washed and incubated for 2 hrs at 4°C with 1.5

ml of the culture medium or the cell lysate. The complex bead-antibody-antigen was then washed, resuspended in 80 μ l of sample buffer 1X and boiled for 5 min. Then, 40 μ l of the samples were loaded per well and separated on 7.5% polyacrylamide gel. Immunoblotting was performed as described below.

Immunoblotting

Equal amount of the culture medium and the cell lysate (20 or 40 μ l) were loaded in each lane and electrophoresed on a 7.5% polyacrylamide gel. Following separation, proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. The nitrocellulose stripes were incubated with the primary antibodies O/N at 4°C. They were then washed with Tris- buffered saline with 0.2% Tween-20 (Sigma) and incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Laboratories, Missisauga, ON, Canada). Membranes were again washed and revealed by chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Quebec, Quebec, Canada). Many tau antibodies were used to visualize either the phosphorylation state or different epitopes of the protein (see Table 1). We also used a mouse monoclonal anti-tubulin (1:2000) (clone DM1A from Sigma) to assess the cell death and a mouse monoclonal anti-GFP antibody (mix of clones 7.1 and 13.1) (1:5000) (Roche Diagnostics).

Treatment with Brefeldin A, Caspase-3 Inhibitor and Low Temperature Assays

Two days after transfection, the culture medium was changed for fresh medium and the cells were treated for 4:30 hrs with brefeldin A (BFA) (Sigma) at a concentration of 5 μ g/ml, diluted in 0.05% of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma). Control cells were treated with 0.05% DMSO. Cells were also treated with the caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK (TOCRIS, Minneapolis, MN, USA). Twenty-four hrs after transfection, the culture medium was changed for fresh medium and the cells were treated with 20 μ M of the caspase-3 inhibitor or 20 μ M of DMSO for 24hrs.

Alternatively, cells were subjected to changes in temperature. To do so, cells were plated in 25 cm² flasks instead of 60-mm petri dishes. The transfection was performed as described above. Two days after transfection, culture medium was changed for

fresh medium and the cells were incubated at 18 or 4°C for 6 hrs. Control cells were incubated at 37°C. The cell lysate and the culture medium containing tau were prepared as described above.

Quantification of Cell Death

Cell death was assessed by the measurement of the LDH activity in the culture medium and the cell lysate using the LDH cytotoxicity assay kit from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA), according to the manufacturer's instructions. The cell death percentage was evaluated by the LDH activity in the culture medium (M) and the cell lysate (L) using the following formula: LDH Activity in M/total LDH Activity (Activity in M + L). Triplicates were performed for each sample. The LDH content in the samples was measured with a BIO-TEK Elx800 plate reader. The percentages of cell death are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM).

Cell death was also evaluated by trypan blue exclusion method. Briefly, Hela cells were cultured on glass coverslip. Two days after transfection, cells were washed twice with PBS and then incubated in 0.2% trypan blue (Sigma) diluted in PBS for 4 min at room temperature (RT). Cells were then washed once with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 5 min at 4°C and 10 min at RT. Cultures were kept in PBS until they were observed by light microscopy. The number of blue cells (dead cells) and total cells were counted on ten different fields and the cell death percentage was evaluated by the ratio of blue cells on total cells.

Quantification of the Signal Detected with Tau Antibodies by Densitometry

Films were scanned with an EPSON PERFECTION 1240U scanner and transparency module EPSON EU-33, using Adobe Photoshop version 7.0 software. Image J software version 1.38X from the National Institute of Health was used to quantify the intensity of the band obtained with the different antibodies in the culture medium and the cell lysate prepared from Hela cells overexpressing either wild-type tau or mutated tau. To compare the secretion levels of wild-type tau with that of tau mutants, A12, E12, tau Δ 413–441 and tau Δ 422–441, the immunoblots were stained with the anti-tau antibody Tau12 that recognizes phosphorylated and non-phosphorylated tau and then

the intensity of bands was measured by densitometry to calculate the ratio of the signal in the culture medium and the cell lysate. To compare the secretion levels of wild-type tau with or without the caspase-3 inhibitor, the immunoblots were stained with the anti-tau antibody Tau12 and then the intensity of bands was measured by densitometry to calculate the ratio of the signal in the culture medium and the cell lysate.

Statistical Analysis

Statistical significance was evaluated with a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett multiple comparisons test against tau mutant E12 for the set of experiments on the effects of phosphorylation on tau secretion and against wild-type tau for the set of experiments on the effects of the C-terminal cleavage on tau secretion. The effect of caspase-3 inhibition on tau secretion was analyzed by a Paired t-test. The statistical analysis was performed using the GraphPad InStat 3 software and $p < 0.05$ was considered significant.

Table 1. List of tau antibodies.

Antibody	Type	Epitope	WB dilution	Source
HT7	Mouse monoclonal	between a.a. 159–163	1:500	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
K9JA	Rabbit polyclonal	a.a. 243–441	1:20 000	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Tau1	Mouse monoclonal	dephosphorylated a.a. 195, 198, 199 and 202	n/a	Millipore, Billerica, MA, USA
Tau12	Mouse monoclonal	Between a.a. 9–18	1:5000–1:20 000	Abcam, Cambridge, MA, USA
Tau46	Mouse monoclonal	a.a. 428–441	1:500	Abcam, Cambridge, MA, USA
AT270	Mouse monoclonal	pT181	1:100	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Phospho-S199	Rabbit polyclonal	pS199	1:1000	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada
CP13	Mouse monoclonal	pS202	1:50	Kindly provided by Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA
Phospho-T205	Rabbit polyclonal	pT205	1:500	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada
Phospho-T212	Rabbit polyclonal	pT212	1:1000	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada
Phospho-S214	Rabbit polyclonal	pS214	1:100	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada
Phospho-T217	Rabbit polyclonal	pT217	1:1000	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada
Phospho-S262	Rabbit polyclonal	pS262	1:1000	Signalway antibody, Pearland, TX, USA
Phospho-S409	Rabbit polyclonal	pS409	1:100	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada
Phospho-S422	Rabbit polyclonal	pS422	1:1000	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada
AT180	Mouse monoclonal	pT231/pS235	1:100	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
PHF-1	Mouse monoclonal	pS396/pS404	1:100	Kindly provided by Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA

doi:10.1371/journal.pone.0036873.t001

Results

Human Tau is Secreted by Hela Cells

Human tau fused to the GFP tag (GFP-tau) was overexpressed in Hela cells. In the cell lysate at 48 hrs after transfection, a tau positive band revealed by the anti-tau antibody Tau12 was found just above 75 kDa as expected when tau is fused to GFP (Figure 1A). A Tau12- positive band at 75 kDa as well as lower molecular weight bands between 37 and 50 kDa and 25 and 37 kDa were consistently observed but at a significantly lower intensity than the band of full-length tau indicating that overexpressed human tau was cleaved in Hela cells. A similar pattern of tau-positive bands was observed with the anti-tau antibody, HT7, and a polyclonal anti-tau antibody (poly anti-tau). No tau-positive band was detected with the anti-tau antibodies Tau12 and HT7 but three non-specific bands were detected with the polyclonal anti-tau antibody when cell lysates were prepared from Hela cells transfected with the empty GFP vector (Figure 1A). Surprisingly, the tau-positive band found at 75 kDa in the cell lysate was also present in the culture medium and became more abundant with time as noted at 24, 41 and 51 hrs after transfection (Figure 1B). However, full-length tau was consistently absent from the culture medium. Tau-positive bands were also noted between 37 and 50 kDa and 25 and 37 kDa in the culture medium as observed in the cell lysate. The fact that tau-positive bands detected in the medium were also noted in the cell lysate could indicate that some extracellular tau remained attached to the cells after washing them before lysis. To verify this possibility, cells were washed with PBS containing 0.5M NaCl, a solution used to remove non-specific binding of proteins at the surface of cultured cells [31]. Under this washing condition, the tau-positive band at 75 kDa was still present in the cell lysate indicating that it could correspond to an intracellular pool of cleaved tau.

We next examined whether tau found in the medium was released by Hela cells either through cell death or secretion. To demonstrate that the presence of tau in the culture medium was not caused by membrane leakage from dying cells but rather by an active process of secretion, three approaches were used. First, the presence of a cytosolic protein such as tubulin in the culture medium from control and cells overexpressing tau

was analyzed (Figure 2A). No tubulin was noted in the culture medium before and after overexpression of human tau consistent with the fact that no cell lysis was induced by the overexpression of human tau in HeLa cells. In the cell lysate of tau transfected cells prepared in 6 ml of lysis buffer for comparison with the 6 ml of medium used to maintain HeLa cells after transfection, tubulin staining was detected (Figure 2A). To further confirm that the presence of tau in the medium was caused by its secretion and not cell lysis, HeLa cells overexpressing tau were partially lysed for few seconds in a solution of 0.01% Triton X-100 to induce some damage at the plasma membrane. In this condition, tubulin and full-length tau were detected in the medium confirming that full-length tau and tubulin would be found in the culture medium if HeLa cells had been damaged by tau overexpression (Figure 2A and B). Second, cell death was evaluated by the trypan blue exclusion method and by the lactate dehydrogenase (LDH) activity measurement in the medium (Figure 2C) [33,34]. From the trypan blue staining, it was possible to conclude that the presence of tau in the medium was not caused by cell death since an important amount of tau was found in the medium even when cell death was evaluated to be less than 1%. The LDH activity in the culture medium was measured for each set of experiments and allowed us to determine that the cell death percentage of HeLa cells overexpressing tau varied from 0% to 5% in most experiments. From the trypan blue staining and LDH activity, no correlation could be established between the percentage of cell death and the amount of tau in the medium confirming the secretion of tau by HeLa cells. Third, to demonstrate that tau was secreted by an active process by HeLa cells, the secretion of tau was examined when the cells were incubated at low temperature, a condition known to decrease secretion by exocytosis [34,35]. The amount of tau in the medium was significantly reduced at low temperature although no difference was noted between 18°C and 4°C (Figure 3A). The percentage of cell death was 0.35 ± 0.35 , 3.2 ± 1.1 and 2.64 ± 1.87 at 37°C, 18°C and 4°C respectively. To eliminate the possibility that the GFP tag which can be secreted when misfolded could contribute to tau secretion, the secretion of human tau fused to a Flag tag was examined in HeLa cells [36]. As noted for GFP-tau, Flag-tau was found in the medium and its secretion was also impaired at low temperature (Figure 3B). The percentage of cell death was 0, 3.67 ± 0.30 and 3.32 ± 0.54 at 37°C, 18°C and 4°C respectively. For both GFP-tau and Flag-tau, an increase of cell

death was noted at low temperature whereas tau secretion was decreased showing that the presence of tau in the culture medium was not imputable to cell lysis.

We next examined whether tau was secreted through the conventional pathway by treating the cells with brefeldin A (BFA), a drug known to inhibit this secretory pathway [37]. BFA did not prevent the secretion of GFP-tau and Flag-tau by HeLa cells indicating that their secretion occurs through a non-conventional pathway (percentage of cell death: 0% for control and BFA treated cells) (Figure 3C and D).

In previous studies, it was shown that secreted tau was found in microvesicles and exosomes [11,30]. We examined whether tau secreted by HeLa cells was included in vesicles. Medium containing tau was centrifuged to isolate microvesicles/exosomes as described by Thery et al. [32]. The presence of tau in the supernatant and pellet was examined by western blotting. The amount of tau present in the supernatant was similar to that found in the medium that has not been centrifuged indicating that the major portion of tau secreted by HeLa cells was not included in microvesicles/exosomes (Figure 3E). However, tau could be detected in the pellet when it was resuspended in a small volume revealing that a small pool of secreted tau was found in microvesicles/exosomes (data not shown).

Human Tau Secreted by HeLa Cells is Cleaved at the C- terminal

Tau secreted in the culture medium was consistently cleaved. Two observations pointed out that tau was most likely cleaved before being secreted by HeLa cells. First, the tau-positive band at 75 kDa as well as lower tau-positive bands present in the culture medium were often observed in the cell lysate. Second, when recombinant human tau protein was added to the culture medium of control cells for 48 hrs, full-length tau was detectable although some degradation had occurred (Figure 4A). This indicated that if full-length tau was secreted by HeLa cells, it should not have been completely degraded in the culture medium after 48 hrs of transfection.

A panoply of antibodies directed against different regions of tau were employed to analyze the cleavage pattern of tau in the culture medium and cell lysate (Table 1). In the cell lysate, all antibodies tested could detect full-length tau (Figure 4B, C, D and E). The band found at 75 kDa in both the cell lysate and culture medium was also detected by all the antibodies tested except for the antibody Tau46 that recognizes the peptidic

sequence located between L428 and L441 [38]. This indicated that tau found at 75 kDa was cleaved at the C-terminal as reported for tau present in the CSF of both humans and tau transgenic mice and for tau secreted by M1C and NB2a/d1 cells [9,14,27,28,29,30].

The band located at 75 kDa mainly present in the medium was immunoreactive to the antibody Tau12 directed against an epitope (9–18 a.a.) located at the N-terminal of tau (Figure 4B). This band was also detected by an anti-GFP antibody confirming that no cleavage had occurred at the N-terminal of tau where the GFP tag was inserted (Figure 4C). The antibody Tau12 could also detect bands found between 37 and 50 kDa and bands between 25 and 37 kDa revealing that the N-terminal was contained in these tau truncated forms (Figure 4B).

The antibody K9JA directed against an epitope located in the microtubule-binding domain (MTBD) of tau revealed the band found at 75 kDa and bands between 37 and 50 kDa and bands between 25 and 37 kDa (Figure 4D). At around 37 kDa, a strong signal was detected with the anti-tau antibody Tau12 and the anti-GFP antibody whereas a weak signal was noted with the K9JA antibody indicating that the MBTD could be cleaved in these tau fragments. Finally, no band lower than 75 kDa was detected with the antibody Tau46 directed against an epitope located at the C-terminal. This implies that the lower tau fragments were generated from cleaved tau found at 75 kDa lacking the C-terminal in both the cell lysate and culture medium (Figure 4E).

Distinct Phosphorylation Pattern of Intracellular and Extracellular Tau

In the cell lysate, full-length tau was phosphorylated at several sites known to be hyperphosphorylated in Alzheimer brain including early (T181, AT8 and S262), intermediate (AT100 and AT180) and late sites (PHF-1 and S422) (Figure 5). Surprisingly, several sites phosphorylated in intracellular tau were either not phosphorylated or less importantly phosphorylated in extracellular tau. The phosphorylation of two of the three sites (S199, S202 and T205) forming the epitope of the antibody AT8, S202 and T205, was not detectable in the medium although a strong signal was observed in the cell lysate (Figure 5C and D). A similar observation was made for the PHF-1 antibody recognizing tau phosphorylated at S396 and S404 as well

as for the antibody pS422 directed against tau phosphorylated at S422 (Figure 5J and L). Extracellular tau was phosphorylated at the sites contained in the epitope of the antibodies AT100 (T212/S214/T217) and AT180 (T231/S235) as well as T181, S199, S262 and S409 (Figure 5A, B, E, F, G, H, I and K). For most phospho-tau antibodies, a band was detected in the medium only after a long film exposure which resulted in the saturation of the signal observed in the cell lysate. This indicated that tau found in the medium was less phosphorylated than intracellular tau. To confirm this, the amount of total tau in the medium and cell lysate was examined using the phospho-independent antibody Tau12. As illustrated in Figure 5, the amount of total tau and phospho-tau was similar in the cell lysate whereas in the medium, the amount of total tau was significantly higher than that of phospho-tau. The above results led us to conclude that extracellular tau was significantly less phosphorylated than intracellular tau.

Phosphorylation Favors the Secretion of Tau by Hela Cells

The decreased phosphorylation of tau found at 75 kDa in the culture medium could indicate that either dephosphorylation favored the secretion of tau or dephosphorylation of tau occurred during the process of secretion in Hela cells. To verify whether dephosphorylation enhanced tau secretion, a tau mutant presenting mutations in alanine at 12 sites (A12) known to be phosphorylated in Hela cells was generated and overexpressed in these cells. Secreted A12 mutant was cleaved and was not more secreted than wild-type tau indicating that dephosphorylation would not be a determinant factor in tau secretion (Figure 6A). To further investigate how phosphorylation modulated tau secretion by Hela cells, we produced a mutant where the 12 above sites were mutated in glutamate (E12) to mimic phosphorylation. Interestingly, this mutant was more secreted than wild-type tau and A12 mutant (Figure 6A). E12 secreted by Hela cells was also cleaved as observed for wild-type tau and A12 mutant. To measure the secretion of wild-type tau, A12 and E12 mutants, the signal of the tau-positive band found at 75 kDa in the medium was quantified by densitometry as well as the signal of the band corresponding to full-length tau and that at 75 kDa present in the cell lysate. The secretion of tau was evaluated by calculating the ratio of the signal obtained with the anti-tau antibody Tau12 in the culture medium (M) and cell lysate (L) (Ratio M/L). The mean of the ratio M/L was 0.16 ± 0.03 , 0.37 ± 0.070 and 0.19 ± 0.03 for wild-type

tau, E12 and A12 respectively (Figure 6B). The secretion of E12 was significantly higher (≈ 2 times) than that of wild-type tau and A12. The percentage of cell death for wild-type tau, E12, A12 and was 4.9 ± 1.59 , 4.33 ± 1.95 and 2.57 ± 1.67 respectively. From the above data, one could conclude that phosphorylation favored the secretion of tau by Hela cells.

Tau Cleaved at D421 is Preferentially Secreted by Hela Cells

Tau present in the culture medium was always cleaved. This could signify that cleaved tau was preferentially targeted to the secretory pathway. To verify this possibility, tau mutants cleaved at the C-terminal were overexpressed in Hela cells. In the previous section (Figure 5), the staining of secreted tau with different phospho-dependent anti-tau antibodies indicated that tau could be cleaved between the a.a. S409 and S422. Indeed, truncated tau present in the medium was immunoreactive to the antibody pS409 but not to the antibody pS422 indicating that this latter site may be cleaved. Two mutants cleaved at either S412 ($\Delta 413-441$) or D421 ($\Delta 422-441$), the cleavage site of caspase-3, were produced and overexpressed in Hela cells [39].

Forty-eight hrs after transfection, the medium was collected and cells were lysed to analyze the presence of cleaved tau in the medium and cell lysate by western blotting. Both cleaved tau mutants were secreted by Hela cells (Figure 6C). Interestingly, tau $\Delta 422-441$ was significantly more secreted than wild-type tau whereas tau $\Delta 413-441$ was secreted at levels similar to wild-type tau. This was well illustrated by the fact that the tau $\Delta 422-441$ mutant was more abundant in the culture medium than in the cell lysate, a distribution that was never observed with wild-type tau. To measure the secretion of wild-type tau, tau $\Delta 413-441$ and tau $\Delta 422-441$, the signal of the tau-positive band found at 75 kDa in the medium and the signal of the band corresponding to full-length tau and that at 75 kDa present in the cell lysate were quantified by densitometry. The secretion of tau was evaluated by calculating the ratio of the signal obtained with the anti-tau antibody Tau12 in the culture medium and cell lysate (Ratio M/L) as described in the previous section. The mean of the ratio M/L was 0.37 ± 0.08 , 0.44 ± 0.09 and 0.82 ± 0.09 for wild-type tau, tau $\Delta 413-441$ and tau $\Delta 422-441$ respectively (Figure 6D). For both tau $\Delta 413-441$ and tau $\Delta 422-441$, it appeared that

they were either not cleaved or only cleaved of few a.a. at the C-terminal during the process of secretion since the highest tau-positive band presented a similar molecular weight in both the cell lysate and culture medium. All together, these results revealed that cleavage of tau at the C-terminal was a crucial step for its secretion and that the cleavage site was a determinant factor regulating the amount of tau that was secreted by Hela cells.

Since tau is preferentially cleaved at D421 by caspase-3, the activity of caspase-3 was inhibited by Z-DEVD-FMK in Hela cells overexpressing wild-type tau [39]. The secretion of tau was evaluated by calculating the ratio of the signal obtained with the anti-tau antibody Tau12 in the culture medium and cell lysate (Ratio M/L) as described above. The mean of the ratio M/L was 0.64 ± 0.076 and 0.42 ± 0.062 for control and treated cells respectively. The ratio M/L of control cells was significantly higher than the ratio of cells treated with the caspase-3 inhibitor. However, the fact that the difference of tau secretion between control and treated cells was $\approx 20\%$ indicated that only a small pool of secreted wild-type tau was cleaved by caspase-3. This is consistent with the fact that wild-type tau was less secreted than the form of tau truncated at D421.

Discussion

In the present study, we demonstrated that overexpressed human tau was secreted by Hela cells through an unconventional secretory pathway. The pool of secreted tau was cleaved at the C-terminal and was less phosphorylated than intracellular tau. Both hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhanced tau secretion by Hela cells.

Our results demonstrating that tau was secreted by an unconventional secretory pathway is consistent with recent studies reporting that tau was found in exosomes in culture medium from MC1 cells overexpressing human tau and that secreted tau by COS-7 and HEK-293 cells was present in microvesicles [11,30]. It remains to be determined whether tau utilizes other non-conventional pathways since a portion of tau in the culture medium of MC1 cells was not associated with exosomes. In the present study, tau secreted by Hela cells could be immunoprecipitated from the culture medium

without using any detergent indicating that it was not included in microvesicles/exosomes. Consistent with this, no decrease of tau in the medium was observed after the culture medium was deprived of microvesicles by ultracentrifugation. All together the above results indicate that tau is most likely secreted by more than one pathways as shown for other proteins involved in neurodegenerative diseases such as SOD1 associated with Amyotrophic lateral sclerosis and the prion protein [40,41,42,43]. In our previous study, we showed that hyperphosphorylated tau was preferentially associated with the rough endoplasmic reticulum (RER) membranes in AD brain and in the tau transgenic mice JNPL3 [44]. An increase of hyperphosphorylated tau was also noted at the Golgi apparatus in the JNPL3 mice [44]. RER and Golgi have been showed to be involved in non-conventional secretory pathways [45]. For example, COPII vesicles budding from the ER and containing tau at their surface could directly fuse with the plasma membrane for secretion [45]. This pathway is also used by the signal-peptide-containing protein, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) [46]. Another possibility is that tau secretion could occur through non-COPII-coated vesicles forming at the ER or vesicles forming at the Golgi having tau attached at their surface [47]. We reported that Tau was found at the surface of RER membranes but this does not exclude the possibility that it could end up on the extracellular surface of the plasma membrane during the fusion process occurring between tau-containing vesicles and the plasma membrane.

Our results demonstrated that cleavage of tau at D421 increased its secretion. The fact that wild-type tau and tau Δ 413–441 were secreted in a similar way by HeLa cells strongly suggests that the major pool of secreted wild-type tau could be cleaved close to S412 in HeLa cells. To further demonstrate this, HeLa cells overexpressing wild-type tau were treated with a caspase-3 inhibitor since tau is preferentially cleaved at D421 by this caspase [39]. When HeLa cells were treated with a caspase-3 inhibitor, a small but significant decrease of wild-type tau secretion was observed. This could indicate that as mentioned above, the major pool of wild-type tau secreted by HeLa cells was not cleaved at D421. From our results, it was not possible to conclude whether tau Δ 413–441 and tau Δ 422–441 underwent further cleavage during the process of secretion.

The fact that they migrated in a similar way in the cell lysate and culture medium could signify that if they were cleaved it was only by a few amino acids. The secretion of tau cleaved mutants indicates that wild-type tau was most likely cleaved before its trafficking in the secretory pathway. Based on a recent study reporting that an increase of caspase activity is an early event in AD and our results showing the enhanced secretion of tau cleaved at the caspase-3 site, one can speculate that the secretion of tau would be enhanced at the initial stage of the disease [48].

Mimicking of hyperphosphorylation significantly enhanced the secretion of tau by Hela cells. However, tau found in the culture medium was dephosphorylated compared to the pool of tau that remained intracellular. This is consistent with a recent study reporting that released tau in the culture medium upon cell lysis was dephosphorylated compared to intracellular tau [26]. In this study, extracellular tau was not phosphorylated at the epitopes recognized by the phospho-tau antibodies, AT8 and PHF-1 whereas intracellular tau was. Tissue non-specific alkaline phosphatases (TNAP) present in the plasma membrane were shown to be responsible for the dephosphorylation of extracellular tau [26]. Interestingly, TNAP were shown to be increased in AD brain [26]. All together, the above data indicate that CSF-tau might be less phosphorylated than intracellular tau. Several studies have examined the phosphorylation of tau found in the CSF of patients affected by a tauopathy. T181 and T231 are the sites that have been extensively used as a diagnostic tool for AD [8]. Although in most studies, the phosphorylation of T231 was shown to be increased in AD, some studies reported that its phosphorylation was reduced at later stages of the disease [18]. However, the phosphorylation of other sites such as the epitopes of AT8 and PHF-1 remains controversial [8]. Our data revealed that these epitopes are preferentially dephosphorylated in secreted tau. The AT8 epitope seems to play a central role in the hyperphosphorylation cascade of tau. Indeed, an increase in phosphorylation of the AT8 epitope is detected at an early stage of AD [49,50,51]. In our previous study, we reported that the phosphorylation of the AT8 epitope had the most significant effects on the phosphorylation of other sites in primary hippocampal neurons [52]. The results of the present study highlight the possibility that the dephosphorylation of this epitope could be regulated in a distinct manner.

In a previous study, it was shown that dephosphorylated tau in the culture medium could act as an agonist of muscarinic M1 and M3 receptors inducing a robust and sustained increase of intracellular calcium that triggered cell death in SH-SY5Y cells [26]. Most importantly, the increase in intracellular calcium induced by dephosphorylated tau in the culture medium was associated with an increase of TNAP expression [26]. Based on these observations and our present data, one could speculate that tau found in the extracellular space in AD brain would be dephosphorylated and thereby would contribute to the aberrant homeostasis of calcium noted in this tauopathy.

From our data and that of other groups, it appears that both extracellular and intracellular tau could contribute to the process of neurodegeneration linked to AD. Furthermore, our data indicate that in AD, hyperphosphorylation of tau would induce a vicious circle that would result in the amplification of its secretion (Figure 7). Indeed, our data revealed that hyperphosphorylation of tau would enhance its secretion and this would in turn increase the amount of dephosphorylated tau in the extracellular space. Dephosphorylated extracellular tau would then induce an increase of intracellular calcium, an event linked to the increase of tau hyperphosphorylation [26]. This increased hyperphosphorylation of tau would further enhance its secretion leading to the emergence of a vicious circle that would promote the propagation of tau pathology in the brain and its accumulation in the CSF. The accumulation of total and phospho-tau in the CSF is used as a diagnostic biomarker for tauopathies [8]. Our data highlight the possibility that the distinct phosphorylation and cleavage pattern of tau could account for its differential accumulation in the CSF among the tauopathies. The characterization of this pattern for each tauopathy could become a powerful tool for their early detection and to distinguish them from one another.

Acknowledgments

The authors would like to thank Mylène Desjardins who generated the tau mutants, A12 and E12, and Miguel Chagnon for his help in the statistical analysis. The authors would

also like to thank Dr. Peter Davies (Albert Einstein University, Bronx, NY, USA) for the phospho-dependent anti-tau antibodies, CP13 and PHF-1. We also thank Dr. Gloria Lee (University of Iowa, Iowa City, IA) and Dr. Ken Kosik (University of California, Santa Barbara, CA, USA) for kindly providing us with the Flag-tau and the GFP- tau4R constructs respectively.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments : NL VP N-VM. Performed the experiments : VP N-VM JR-M JB. Analyzed the data : VP N-VM ML NL. Wrote the paper : VP N-VM NL.

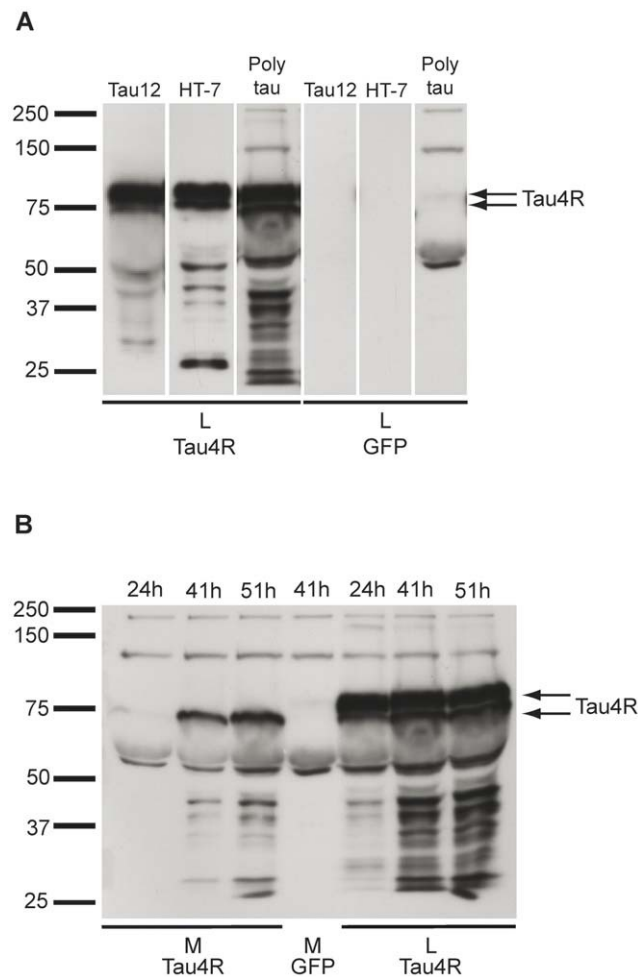


Figure 1. Overexpressed human tau in HeLa cells is found in the culture medium. (A) In the cell lysate (L) prepared from HeLa cells overexpressing human tau fused to the GFP tag, a tau- positive band just above 75 kDa and a band at 75 kDa corresponding to full-length and cleaved tau, respectively, were observed with the anti-tau antibodies Tau12, HT7 and a polyclonal antibody (arrows). No signal was detected with the anti-tau antibodies in L prepared from HeLa cells transfected with the empty GFP-vector except for three non-specific bands detected with the polyclonal anti-tau antibody. Tau-positive bands migrating between 37 and 50 kDa and 25 and 37 kDa were also observed with the anti-tau antibodies. (B) The tau-positive band found at 75 kDa in L was also detected in the culture medium (M) and it increased with time as noted at 24, 41 and 51 hrs after transfection. No tau-positive bands were noted in M collected from cells transfected with the empty GFP vector except one non-specific band at 50 kDa detected with the polyclonal anti-tau antibody. Doi :10.1371/journal.pone.0036873.g001

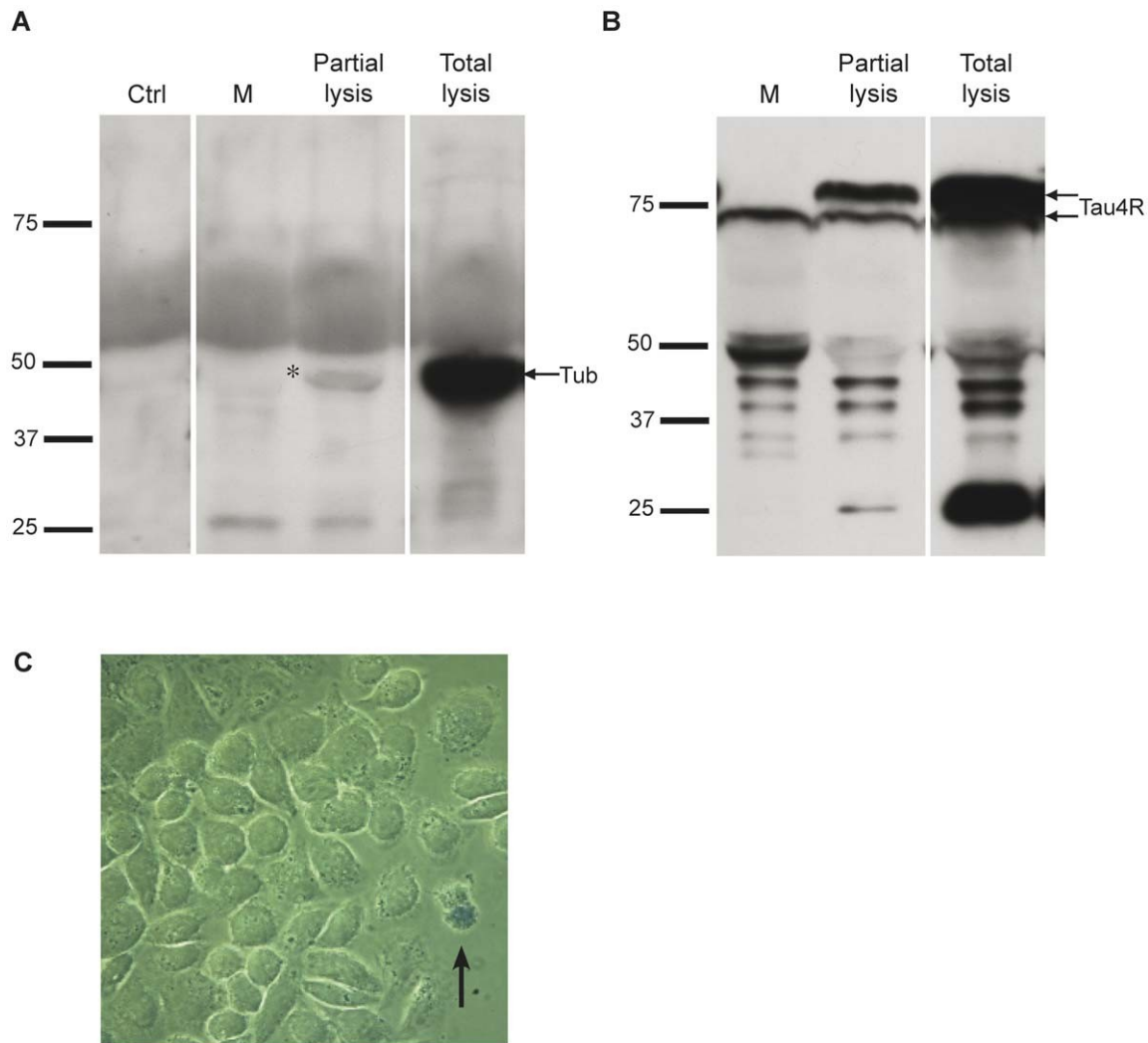


Figure 2. Overexpressed human tau is secreted by HeLa cells. (A) No tubulin was noted in M before and after overexpression of human tau whereas tubulin staining was detected in the cell lysate (Total lysis) prepared in 6 ml of lysis buffer for comparison with the 6 ml of medium used to maintain HeLa cells after transfection (arrow). In M collected from HeLa cells overexpressing tau that were partially lysed (Partial Lysis) for few seconds in a solution of 0.01% Triton X-100 to induce some damage at the plasma membrane, tubulin staining became detectable (asterisk). (B) Cleaved tau was detected in M and L (lower arrow) whereas full-length tau was only detected in L (upper arrow in Total lysis). Full-length tau became detectable in M when HeLa cells were partially lysed (Partial lysis) with a solution of 0.01% Triton X-100 (upper arrow). (C) HeLa cells overexpressing human tau were stained with Trypan blue before being fixed to evaluate the percentage of cell death. Blue cells (arrow) corresponded to dead cells that had taken up Trypan blue.
 Doi :10.1371/journal.pone.0036873.g002

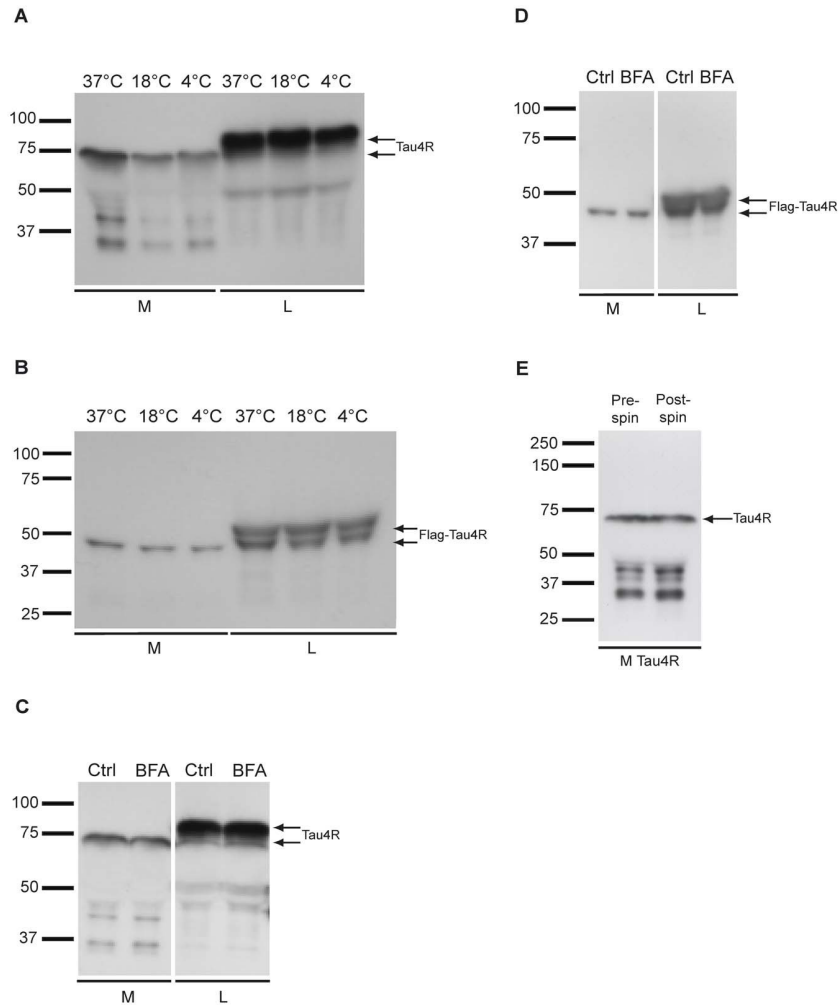


Figure 3. Secretion of human tau is reduced at low temperature and is not prevented by BFA treatment. (A) The amount of GFP-tau in M (lower arrow) was reduced at low temperature (18°C and 4°C) whereas the expression of tau was not affected (upper arrow). (B) Human tau fused to a Flag tag was also secreted by HeLa cells. Secreted Flag-tau was cleaved as noted for GFP-tau (upper and lower arrows). The secretion of Flag-tau (lower arrow) but not its expression (upper arrow) was also impaired at low temperature. (C and D) The secretion of both GFP-tau and Flag-tau was not affected by BFA. Control cells (Ctrl) were treated with DMSO, the vehicle of BFA. BFA treatment was tested at least in three sets of experiments. E) The amount of wild-type tau in M was not decreased after ultracentrifugation to remove microvesicles/exosomes. Doi :10.1371/journal.pone.0036873.g003

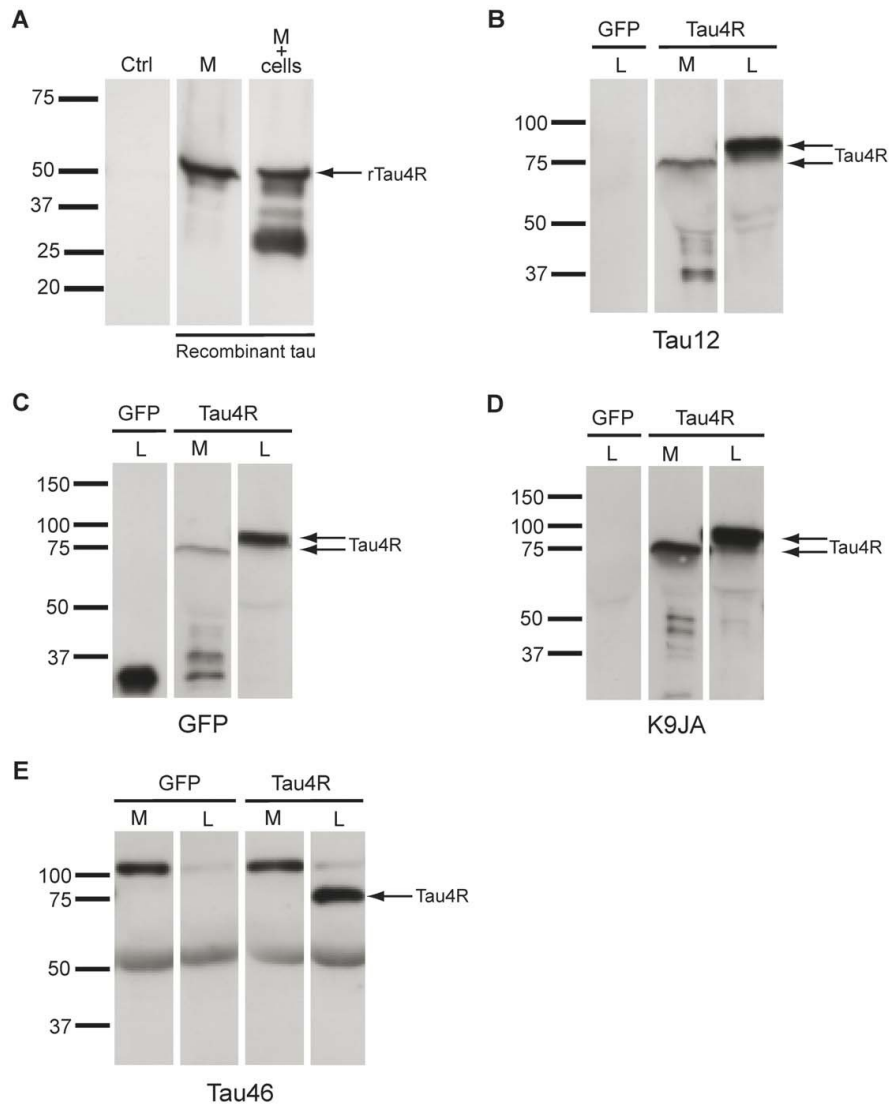


Figure 4. Secreted tau is cleaved at the C-terminal. (A) Full-length recombinant human tau protein (rTau4R) was still detectable in the culture medium after being added to control HeLa cells for 48 hrs (arrow, M+cells). rTau4R was less degraded when it was added to M without cells (M) (B) Secreted tau is not cleaved at the N-terminal as revealed by the anti-tau antibody Tau12 directed against the 9–18 a.a. A Tau12-positive band was detected in both L and M prepared from HeLa cells overexpressing GFP-tau4R corresponding to full-length and cleaved tau (upper and lower arrows).

(C) GFP tag inserted at the N-terminal of tau was detected in tau present in both L and M (upper and lower arrows). (D) The microtubule-binding domain of tau was not cleaved in tau secreted by HeLa cells as revealed by the K9JA antibody (lower arrow). (E) The band found at 75 kDa in both L and M was not detected by the antibody Tau46 that recognizes the peptidic sequence located between L428 and L441. Only full-length tau present in L was detected with this antibody (arrow). A non-specific band at 100 kDa was noted with the antibody Tau46 in M. The pattern of each antibody was analyzed at least in 3 sets of experiments.

Doi :10.1371/journal.pone.0036873.g004

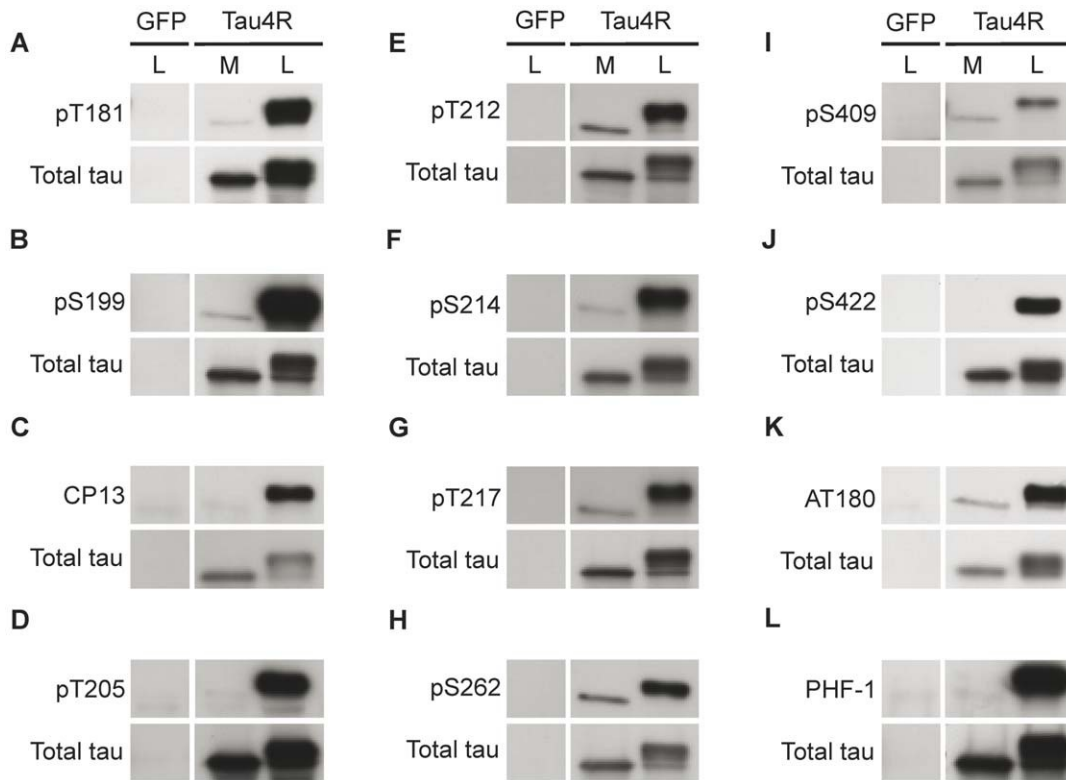


Figure 5. Secreted tau is dephosphorylated compared to intracellular tau. (A, B, E, F, G, H, I and K) Secreted tau was phosphorylated at T181, S199, T212, S214, T217, S262, S409 and at the epitope of the AT180 antibody (T231/S235) but to a lesser extent than intracellular tau. (C, D, J and L) No signal was detected in M with the phospho-tau antibodies directed against phosphorylated S202 (CP13), T205 (pT205), S422 (pS422) and the S396/S404 (PHF-1) whereas a strong signal was observed in L with these antibodies. Tau12 antibody was used to reveal total tau in M and L. The pattern of each antibody was analyzed at least in 3 sets of experiments. Doi :10.1371/journal.pone.0036873.g005

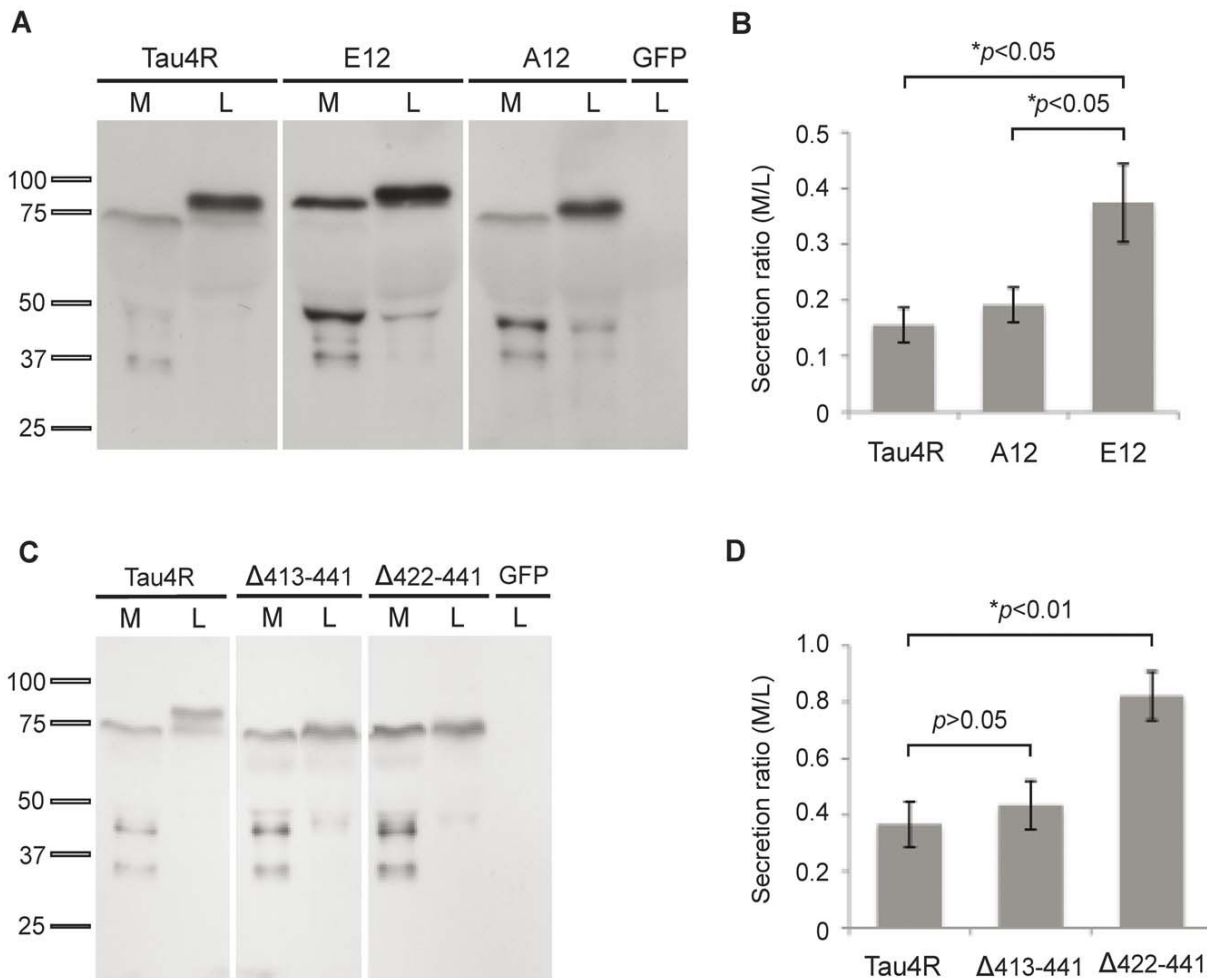


Figure 6. Phosphorylation and cleavage at the caspase-3 site enhance tau secretion by HeLa cells. (A) Secreted A12 and E12 mutants were cleaved in M as their migration was faster in M than in L. A12 was secreted in a manner similar to that of wild-type tau whereas E12 was more secreted than wild-type tau and A12. In both M and L, E12 displayed a decrease in electrophoretic mobility compared to wild-type tau and A12. The Tau12 antibody was used to reveal tau in L and M. No signal was detected in L prepared from HeLa cells transfected with the empty GFP vector (GFP). (B) Quantification of the secretion ratio M/L of wild-type tau (tau4R), A12 and E12. (C) Two tau mutants cleaved at either S412 ($\Delta 413-441$) or D421 ($\Delta 422-441$), the cleavage site of caspase-3, were secreted by HeLa cells. Tau $\Delta 422-441$ was significantly more secreted than wild-type tau whereas tau $\Delta 413-441$ was secreted at similar levels as wild-type tau. No signal was noted with the anti-tau antibody, Tau12, when cells were transfected with the empty GFP vector (GFP). (D) Quantification of the secretion ratio M/L of wild-type tau (tau4R), tau $\Delta 413-441$ and tau $\Delta 422-441$. The bars represent the mean of 4 experiments \pm SEM. $P < 0.05$.

doi :10.1371/journal.pone.0036873.g006

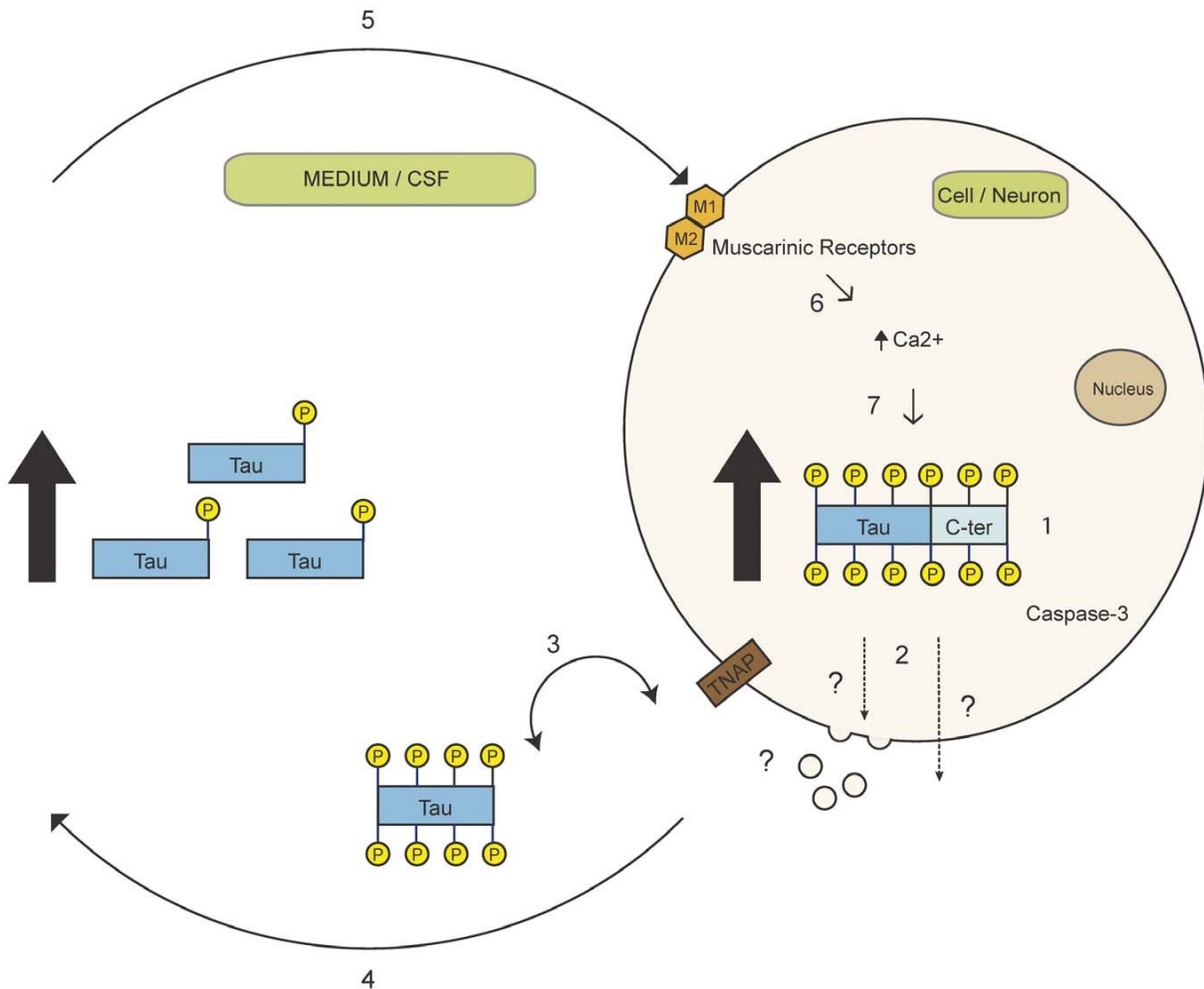


Figure 7. A schematic representation of the vicious cycle leading to the amplification of tau secretion in AD. In AD, tau becomes hyperphosphorylated (1). This hyperphosphorylation would enhance its secretion by either exosomes/microvesicles or another unconventional secretory pathway (2). Extracellular hyperphosphorylated tau would be dephosphorylated by TNAP present at the plasma membrane (3) and this would result in an increase of dephosphorylated tau in the extracellular space (4). Dephosphorylated extracellular tau would activate the muscarinic receptors (5) and this would induce an increase of intracellular calcium (6), an event linked to the increase of tau hyperphosphorylation (7). This further increase of hyperphosphorylated tau would initiate a vicious circle that would enhance tau secretion. Doi :10.1371/journal.pone.0036873.g007

References

1. Mandell J, Banker G (1996) Microtubule-associated proteins, phosphorylation gradients, and the establishment of neuronal polarity. *Perspect Dev Neurobiol* 4: 125–135.
2. Lee V, Goedert M, Trojanowski J (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24: 1121–1159.
3. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L (2011) The many faces of tau. *Neuron* 70: 410–426.
4. Alafuzoff I, Iqbal K, Friden H, Adolfsson R, Winblad B (1987) Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis. *Acta Neuropathol* 74: 209–225.
5. Arriagada P, Growdon J, Hedley-Whyte E, Hyman B (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42: 631–639.
6. Bierer L, Hof P, Purohit D, Carlin L, Schmeidler J, et al. (1995) Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52: 81–88.
7. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239–259.
8. Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, et al. (2010) Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 45: 30–40.
9. Kim W, Lee S, Hall GF (2010) Secretion of human tau fragments resembling CSF-tau in Alzheimer's disease is modulated by the presence of the exon 2 insert. *FEBS Lett* 584: 3085–3088.
10. Kim W, Lee S, Jung C, Ahmed A, Lee G, et al. (2010) Interneuronal transfer of human tau between Lamprey central neurons in situ. *J Alzheimers Dis* 19: 647–664.
11. Simon D, Garcia-Garcia E, Royo F, Falcon-Perez JM, Avila J (2012) Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett* 586: 47–54.

12. de Calignon A, Polydoro M, Suarez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, et al. (2012) Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron* 73: 685–697.
13. Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, et al. (2012) Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PloS One* 7: e31302.
14. Barten DM, Cadelina GW, Hoque N, DeCarr LB, Guss VL, et al. (2011) Tau transgenic mice as models for cerebrospinal fluid tau biomarkers. *J Alzheimers Dis* 24 Suppl 2: 127–141.
15. Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung KY, Saxton MJ, et al. (2007) Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem* 282: 23645–23654.
16. Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Van Kerschaver E, Van Der Perre B, et al. (2000) Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid : a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett* 285 : 49–52.
17. Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, Clark CM, Aisen PS, et al. (2009) Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* 65 : 403–413.
18. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, et al. (2004) Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease : a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry* 61 : 95–102.
19. Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Arai H, DeBernardis J, et al. (2003) Differentiation of geriatric major depression from Alzheimer's disease with CSF tau protein phosphorylated at threonine 231. *Am J Psychiatry* 160: 376–379.
20. Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Tapiola T, Arai H, et al. (2002) Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231. *Arch Neurol* 59: 1267–1272.
21. Hampel H, Burger K, Pruessner JC, Zinkowski R, DeBernardis J, et al. (2005) Correlation of cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine

- 231 with rates of hippocampal atrophy in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 62: 770–773.
22. Kohnken R, Buerger K, Zinkowski R, Miller C, Kerkman D, et al. (2000) Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 287: 187–190.
 23. Hampel H, Teipel SJ (2004) Total and phosphorylated tau proteins: evaluation as core biomarker candidates in frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 17 : 350–354.
 24. Hampel H, Buerger K, Kohnken R, Teipel SJ, Zinkowski R, et al. (2001) Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231. *Ann Neurol* 49: 545–546.
 25. Blennow K, Hampel H (2003) CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2: 605–613.
 26. Diaz-Hernandez M, Gomez-Ramos A, Rubio A, Gomez-Villafuertes R, Naranjo JR, et al. (2010) Tissue non-specific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J Biol Chem* 285: 32539–32548.
 27. Johnson GV, Seubert P, Cox TM, Motter R, Brown JP, et al. (1997) The tau protein in human cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease consists of proteolytically derived fragments. *J Neurochem* 68: 430–433.
 28. Ishiguro K, Ohno H, Arai H, Yamaguchi H, Urakami K, et al. (1999) Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 270: 91–94.
 29. Borroni B, Gardoni F, Parnetti L, Magno L, Malinverno M, et al. (2009) Pattern of Tau forms in CSF is altered in progressive supranuclear palsy. *Neurobiol Aging* 30: 34–40.
 30. Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, et al. (2011) Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid (CSF) in early Alzheimer's Disease. *J Biol Chem* 287: 3842–3849.
 31. Madeira A, Pomet JM, Prochiantz A, Allinquant B (2005) SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein

- cytoplasmic subdomain. *FASEB J* 19: 1905–1907.
32. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3: Unit 3 22.
 33. Nicholson AM, Ferreira A (2009) Increased membrane cholesterol might render mature hippocampal neurons more susceptible to beta-amyloid-induced calpain activation and tau toxicity. *J Neurosci* 29: 4640–4651.
 34. Lee HJ, Patel S, Lee SJ (2005) Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 25: 6016–6024.
 35. Saraste J, Palade GE, Farquhar MG (1986) Temperature-sensitive steps in the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6425–6429.
 36. Tanudji M, Hevi S, Chuck SL (2002) Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway. *J Cell Sci* 115: 3849–3857.
 37. Helms JB, Rothman JE (1992) Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 360: 352–354.
 38. Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J (1996) The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 271: 32789–32795.
 39. Rissman R, Poon W, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, et al. (2004) Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest* 114: 121–130.
 40. Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, et al. (2006) Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 9: 108–118.
 41. Gomes C, Keller S, Altevogt P, Costa J (2007) Evidence for secretion of Cu,Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 428: 43–46.
 42. Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A, et al. (2009) Prions

- hijack tunneling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 11: 328–336.
43. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, et al. (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9683–9688.
 44. Perreault S, Bousquet O, Lauzon M, Paiement J, Leclerc N (2009) Increased association between rough endoplasmic reticulum membranes and mitochondria in transgenic mice that express P301L tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 503–514.
 45. Nickel W, Rabouille C (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 148–155.
 46. Yoo JS, Moyer BD, Bannykh S, Yoo HM, Riordan JR, et al. (2002) Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem* 277: 11401–11409.
 47. Ponnambalam S (2003) Protein secretion and the Golgi apparatus. *Mol Membr Biol* 20: 97–98.
 48. de Calignon A, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, et al. (2010) Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464: 1201–1204.
 49. Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, et al. (1996) Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* 7: 177–181.
 50. Lauckner J, Frey P, Geula C (2003) Comparative distribution of tau phosphorylated at Ser262 in pre-tangles and tangles. *Neurobiol Aging* 24: 767–776.
 51. Maurage C-A, Sergeant N, Ruchoux M-M, Hauw J-J, Delacourte A (2003) Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology. *Acta Neuropathol* 105: 89–97.
 52. Bertrand J, Plouffe V, Senechal P, Leclerc N (2010) The pattern of human tau phosphorylation is the result of priming and feedback events in primary hippocampal neurons. *Neuroscience* 168: 323–334.

III. Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons

N-V. MOHAMED et al, Scientific Reports 2014

Contribution

N.-V.M. was involved in all the experiments included in the present study and prepared figures 1, 2, 3, 4 and 5. V.P. performed tau immunoprecipitation for figures 1 and 4 and analyzed the results presented in figure 5A and B. G.R.-L. performed the morphological analysis for figure 2C and participated to the analysis of the results included in figure 5A and B.N.L. wrote the paper. E.P. was involved in the in vitro dephosphorylation assay. All the authors reviewed the paper.

Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons

Nguyen-Vi Mohamed¹, Vanessa Plouffe¹, Gaudeline Rémillard-Labrosse¹, Emmanuel Planel² & Nicole Leclerc¹

1 Département de Neurosciences, Université de Montréal, C.P.6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7,

2 Centre Hospitalier de l'Université Laval, Neurosciences, RC-9800, 2705 Boulevard Laurier Québec (QC), Canada, G1V 4G2.

Abstract

Recent studies have demonstrated that human tau can be secreted by neurons and non-neuronal cells, an event linked to the propagation of tau pathology in the brain. In the present study, we confirmed that under physiological conditions, one tau-positive band was detected in the culture medium with an anti-tau antibody recognizing total tau and the Tau-1 antibody directed against unphosphorylated tau. We then examined whether tau secretion was modified upon insults. Tau secretion was increased by starvation [Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)], inhibition of lysosomal function (leupeptin) and when both of these conditions were superimposed, this combined treatment having the most important effects on tau secretion. Interestingly, the pattern of tau secretion was distinct from that of control neurons when neurons were treated either with EBSS alone or EBSS + leupeptin. In these conditions, three tau-positive bands were detected in the culture medium. Two of these three bands were immunoreactive to Tau-1 antibody revealing that at least two tau species were released upon these treatments. Collectively, our results indicate that insults such as nutrient deprivation and lysosomal dysfunction observed in neurodegenerative diseases could result in an increase of tau secretion and propagation of tau pathology in the brain.

Introduction

Neurofibrillary tangles (NFTs) composed of misfolded aggregated tau protein propagate in a predictable manner in Alzheimer's disease (AD)¹⁻⁴. It is still unclear how NFTs spread in human brain. In recent years, a new concept has emerged that in several neurodegenerative diseases including AD, the spreading of misfolded protein aggregates in brain would result from cell-to-cell transmission⁵⁻⁸. This implies that NFTs would propagate in the brain by the release of misfolded tau aggregates from an affected neuron followed by its

uptake in neighboring neurons. Consistent with this, recent studies, including our own demonstrated that tau can be secreted and endocytosed both *in vitro* and *in vivo*⁹⁻²¹. Most interestingly, in a transgenic mouse model where human tau overexpression was restricted to the entorhinal cortex, the first region to be affected in AD, the spreading of tau pathology was observed along synaptically connected circuits^{22,23}. Although the mechanisms of the trans-synaptic spreading of tau pathology remain elusive, secretion of tau by pre-synaptic neurons and its uptake by post-synaptic neurons appear as a plausible cascade of events underlying the propagation of tau pathology in the brain.

Although it cannot be excluded with certainty that tau is not released in the extracellular space by dying neurons in AD brain, the presence of tau in the interstitial fluid in tau transgenic mice brain as well as the presence of tau in the cerebrospinal fluid (CSF) of tau transgenic mice before neurodegeneration indicate that extracellular tau can be released by an active process of secretion *in vivo*^{13,24}. *In vitro*, human tau was shown to be secreted by several non-neuronal and neuronal cell lines when it was overexpressed⁸. More recently, endogenous tau was shown to be secreted by primary cortical neurons in normal conditions and this event increases upon neuronal activity²⁵. In non-neuronal and neuronal cell lines, it was reported that tau secretion occurs through non-conventional secretory pathways^{12,14,18,26,27}. This conclusion was mainly based on the fact that tau was found in exosomes and that the secretion of endogenous and overexpressed tau was insensitive to brefeldin A, a drug that blocks the conventional secretory pathway^{18,26,27,28}. However, tau secretory pathways remain to be fully characterized.

Both full-length and cleaved tau were reported to be secreted *in vitro*. Secreted endogenous tau from primary cortical neurons, SH-SY5Y and iCell® neurons was full-length whereas overexpressed human tau secreted by M1C and Hela cells was cleaved at the C-terminal^{14,16,25}. The overexpression of human tau in HEK293T resulted in the secretion of either full-length or cleaved species^{16,27}. The phosphorylation state of secreted tau was also examined. Depending on the cell type, overexpressed human tau secreted by non-neuronal cells was either phosphorylated or importantly dephosphorylated at several sites^{12,14}. Interestingly, the pool of tau found in exosomes produced by M1C cells overexpressing human tau was phosphorylated at several epitopes (AT180, AT100, AT270, AT8 and PHF-1) detected in AD brain, tau phosphorylated at T181 being enriched in exosomes¹⁸. In the case

of tau secreted by primary cortical neurons, one study reported that it was phosphorylated at T181 and two studies showed that it was dephosphorylated at the epitope recognized by the Tau-1 antibody^{16,25}.

An increase of tau in the CSF is noted in several neurodegenerative diseases including AD indicating that tau might be more secreted in pathological conditions²⁹. In the present study, we examined whether tau secretion by primary cortical neurons would be modified upon insults. Both starvation by incubating neurons in EBSS and inhibition of lysosomal function by treatment with leupeptin significantly increased tau secretion. However, the most important increase of tau secretion was observed when both insults were superimposed. Upon EBSS and EBSS + leupeptin (E + L) but not leupeptin treatment, the pattern of tau secretion differed from that of control neurons. As a result of these treatments, three tau-positive bands were detected in the medium. Furthermore, two pools of tau were secreted by EBSS and E + L treated neurons based on their immunoreactivity to the Tau-1 antibody recognizing unphosphorylated tau. The present results revealed that starvation and lysosomal dysfunction exert positive effects on tau secretion and therefore these insults could contribute to the increased release of tau in pathological conditions.

Experimental Procedures

Preparation and transfection of mouse primary cortical neurons

The use of animals and all surgical procedures described in this article were carried out according to *The guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care*. Primary cortical cultures were prepared from E16 mouse embryos (C57BL6 mice). The cerebral cortices were treated with trypsin (0.025% at 37°C for 20 min). The reaction was stopped with trypsin inhibitor solution containing DNase. Neurons were dissociated by several passages through a Pasteur pipette. The cells were then plated either on glass coverslips or on culture dishes coated with polylysine and laminin (Sigma, Oakville, ON, Canada). The neurons were maintained in Neurobasal medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with glutamax (Invitrogen) and B27 (Invitrogen). When specified, six days after plating, Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used to transfect neurons with pmRFP-LC330. Briefly, for 2 petris, 1 µg of plasmid DNA was mixed with 50 µl of Opti-MEM medium (Invitrogen), and 4 µl of Lipofectamine 2000 was mixed with 50 µl of Opti-MEM medium. Both mixtures were incubated for 5 min then combined and left standing for

20 min. The culture medium of each petri was removed, stored at 37°C for further use and replaced with 2 ml of fresh medium to which 40 µl of the DNA-Lipofectamine mix was added. After an incubation of 90 min at 37°C, cells were washed with a Hanks' balanced salts solution and the stored culture medium was put back in each petri.

Treatment with EBSS and leupeptin

Seven days after plating, neurons were incubated either in EBSS alone (Invitrogen), 20 µM leupeptin (Sigma) diluted in water or EBSS and 20 µM leupeptin for 3–9 hrs. Control cells were incubated in complete Neurobasal medium for 3–9 hrs. Then, the medium was harvested and the cells lysed as described below.

Quantification of cell death and cell membrane integrity

Cell death was evaluated by trypan blue exclusion method. Briefly, neurons were cultured on glass coverslips. Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and then incubated in 0.2% trypan blue (Sigma) diluted in PBS for 4 min at room temperature (RT). Cells were then washed once with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min at 4°C and then 10 min at RT. The number of blue cells (dead cells) and total cells were counted in ten different fields and the cell death percentage was evaluated by the ratio of blue cells on the total number of cells.

Cell membrane integrity was assessed by the measurement of the LDH activity in the culture medium using the LDH cytotoxicity assay kit from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA), according to the manufacturer's instructions. Triplicates were performed for each sample. The LDH content in the samples was measured with a BIO-TEK Elx800 plate reader.

Preparation of cell lysates

After the culture medium was collected, the cells were immediately washed twice with PBS and once with PBS containing 0.5 M NaCl to detach proteins non-specifically attached to the cell surface³¹. The cells were then lysed in modified RIPA buffer [Tris Hcl pH 7.5 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.5%, sodium deoxycholate (SDC) 0.5%, sodium dodecyl sulfate (SDS) 1%, dithiothreitol (DTT) 1 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 5 mM], protease inhibitor cocktail 1× (Complete EDTA-free from Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), phosphatase inhibitor cocktail 2× (PhosSTOP from Roche Diagnostics). Protein assay was performed with Bio-Rad DC Protein assay (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada).

Immunoprecipitation of tau from culture medium

After treatment, the culture medium was collected from control and treated cells and centrifuged at 3000 RPM for 10 min at RT to remove cell debris. To analyze the pattern of secreted tau isoforms, tau was immunoprecipitated from the culture medium. For each condition, 60 μ l of magnetic beads coupled with anti-mouse antibodies (Invitrogen, Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG) or with anti-rabbit antibodies (Invitrogen, Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG) were washed in PBS containing 0.1% BSA and incubated O/N at 4°C with one of the following antibodies : 0.4 μ g Tau-5 (Invitrogen) or 2 μ g A0024 (DAKO) respectively. The beads were then washed and incubated for 2 hrs at 4°C with 1.5 ml of the culture medium. The complex bead-antibody-antigen was then washed in PBS, resuspended in 30 μ l of sample buffer 1 \times and boiled for 5 min. Immunoblotting was performed as described below.

Immunoblotting

Equal amounts of proteins were loaded in each lane and electrophoresed on a 10% polyacrylamide gel. Following SDS-PAGE separation, proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. Then the membranes were incubated in 5% milk diluted in 0.2% Tween-20 Tris buffered saline (TBST) for 1 hr. The nitrocellulose stripes were incubated with the primary antibodies O/N at 4°C. They were then washed in TBST and incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibodies. Membranes were again washed and revealed by chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Quebec, Quebec, Canada). The image acquisition and densitometry were performed with a ChemiDoc™ MP System. After incubation with tau antibodies, membranes were stripped to visualize the level of γ -actin (Santa-Cruz Biotechnology Inc, Santa-Cruz, CA) as a loading control for the cell lysates. Membranes were also incubated with the mouse or rabbit peroxidase-conjugated secondary antibodies to reveal IgG as a loading control for immunoprecipitates. The quantification of LC3-II was done according to the procedure recommended in the last version of Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy published in 2012³². The changes of LC3-II levels were quantified in comparison to those of actin and not to those of LC3-I.

Dephosphorylation of tau by lambda-protein phosphatase

Cells were lysed in Ripa buffer (1 mM PMSF, protease inhibitors cocktail 1 \times , 1 μ M

okadaic acid, 0.25% Na-deoxycholate, 50 mM Tris-Hcl pH7.4, 1% Nonidet P-40, 0.9% NaCl, 1 mM EDTA) with a syringe and centrifuged at 20000× G for 20 min at 4°C. Forty µl of supernatant was mix with 200 units of lambda protein phosphatase (BioLabs) and incubated at 30°C for 3 hrs. The reaction was stopped by adding 1× sample buffer and boiled for 5 min at 95°C.

Immunofluorescence on primary cortical neurons

Treated neurons grown on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde prepared in PBS for 30 min. Neurons were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min. Cultures were kept in PBS until they were processed for immunofluorescence. For immunofluorescence, coverslips were blocked with 5% normal goat serum (NGS) (Invitrogen) in PBS. Then coverslips were stained with the antibody A0024 (1 :500) (DAKO). After 3 washes in PBS, coverslips were incubated with anti-rabbit antibody coupled to FITC (1 :500, Jackson ImmunoResearch). The antibody was diluted in the blocking solution. Incubations were carried out at RT for 1 hr. Coverslips were then washed in PBS and mounted in mowiol. Labeled cells were visualized with an axioplan Zeiss fluorescence microscope using either ×63 or ×100 objective.

Formation of autophagosomes was quantified in control and neurons treated with either EBSS alone or EBSS + leupeptin that were transfected with RFP-LC3. The formation of autophagosomes was confirmed by the presence of RFP-LC3 positive dots.

Electron microscopy

Primary cortical neurons were fixed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4 ; 37°C) containing 1.0% glutaraldehyde (MECALAB, Québec, Canada) and 1.5% tannic acid (Fisher, Québec, Canada). Cells were postfixated with 1% osmium tetroxide (EMS, PA, USA) in cacodylate buffer at 4°C. After several washes in buffer, neurons were dehydrated in graded ethanol, infiltrated and embedded in Epon 812 (MECALAB), according to standard technique³³. Ultrathin sections were obtained using a Reichert Ultracut S ultramicrotome, and mounted on formvar-carbon coated nickel grids (MECALAB). Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examination was performed with a Philips CM 100 electron microscope.

Statistical analysis

The Gaussian distribution of the data was analyzed using the Kolmogorov and Smirnov

method ($p > 0.05$). Statistical significance was evaluated with a two-tailed Paired t-test for the quantification of the percentage of neurons presenting the formation of LC3 positive structures, the increase of LC3-II analyzed by western blotting, the analysis of cell viability and the amount of LDH released in the culture medium. A one-way analysis of variance (ANOVA) Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test was used to compare the increase of LDH between the treatments. The ratio LDH in the medium of treated neurons/LDH in the medium of control neurons was used for this analysis since for leupeptin treated neurons, LDH was measured in complete medium whereas for EBSS and EBSS + leupeptin treated neurons, LDH was measured in EBSS. A two-tailed Paired t-test was used for the analysis of the amount of tau secretion when the data presented a Gaussian distribution and a Wilcoxon signed-rank test if the data did not present a Gaussian distribution. A Wilcoxon signed-rank test was used to analyze the changes of tau phosphorylation in treated neurons since these data did not present a Gaussian distribution. The statistical analysis was performed using the GraphPad InStat 3 software and $p < 0.05$ was considered significant. To compare the effects of the three treatments on tau secretion, statistical significance was evaluated with a two-way ANOVA with match values followed by Tukey's multiple comparison test. The ANOVA analysis was performed using Prism 6.0c software.

Results

A significant increase of tau secretion by primary cortical neurons upon starvation

In two recent studies, it was shown that endogenous full-length tau could be secreted by primary cortical neurons^{16,25}. We examined tau secretion by these neurons after 7 days of plating and confirmed that tau was released in the medium (Figure 1a). In the cell lysate, two main bands at 52 and 57 kDa were detected with the anti-tau antibody A0024 from DAKO, a marker of total tau. As previously reported, a single band located at 52 kDa was detected in the medium by the antibody recognizing total tau when tau was enriched from the culture medium by immunoprecipitation²⁵. To demonstrate that tau found in the medium was not released by neuronal cell death, the trypan blue exclusion method was used to monitor cell death. The percentage of the cell viability was 99.7 ± 0.108 in 6 independent cultures ($p < 0.0001$). This low percentage of cell death indicated that tau found in the medium was most likely released by a specific process of secretion as previously shown²⁵.

We then investigated whether tau secretion would be altered upon insults. Neurons are very sensitive to nutrient deprivation, a condition that can occur in neurodegenerative diseases including AD³⁴. In the present study, nutrient deprivation was induced by incubating neurons in EBSS, a medium containing glucose but devoid of amino acids and growth factors. EBSS is known to result in an extreme induction of autophagy characterized by the accumulation of autophagic vacuoles (AVs) in neurons³⁵. Two approaches were used to monitor the formation of AVs. Firstly, the production of LC3-II, a phosphatidylethanolamine-modified isoform of LC3-I generated and translocated to nascent autophagosomes when macroautophagy is induced was examined in the cell lysate of treated neurons by western blotting (Figure 2a)³⁶. In EBSS treated neurons, the increase of LC3-II was not statistically significant. A similar observation was reported in a previous study performed in primary cortical neurons under extreme induction of autophagy where the high turnover of LC3-II prevented its accumulation³⁵. Secondly, the accumulation of AVs by EBSS was confirmed by using RFP-LC3, a marker of autophagosomes, on fixed neurons³⁰. As expected, the number of neurons presenting AVs was significantly higher for neurons incubated in EBSS than for control neurons (Figure 2b).

Interestingly, when neurons were incubated in EBSS, the pattern of tau secretion differed from that of control neurons (Figure 1a). In the culture medium of control neurons, only one tau-positive band was detected with the antibody A0024 whereas in the medium of treated neurons, three tau-positive bands were found, one at 52 kDa also present in control neurons, and two additional bands, one at 57 kDa noted in the cell lysate and one at 47 kDa. The band at 52 kDa was the most abundant tau-positive band in the medium of treated neurons. The band at 47 kDa indicated that secreted tau was cleaved and/or dephosphorylated (see below). Furthermore, tau secretion was increased ~5 times ($p = 0.014$) by EBSS treatment (Figure 1b). To eliminate the possibility that tau was released by cell death in the medium of treated neurons, cell viability was evaluated using the trypan blue exclusion method. The percentage of neurons taking up trypan blue was evaluated to be less than 1% for both control and treated neurons and was not significantly different between these two groups ($p = 0.8733$). The above observations indicated that the increased release of tau could occur by a specific process of secretion upon EBSS treatment.

A significant increase of tau secretion by primary cortical neurons is observed when lysosomal function is inhibited

In several neurodegenerative diseases including AD, lysosomal function has been shown to be deficient. We verified if such a condition would affect tau secretion by primary cortical neurons. Lysosomal function was inhibited by leupeptin, an inhibitor of cysteine and aspartyl proteases such as cathepsins found in lysosomes. The pattern of tau secretion upon leupeptin treatment was identical to that noted in normal conditions as a single tau-positive band located at 52 kDa was detected in the culture medium (Figure 1a). However, tau secretion was increased ~ 2 times ($p = 0.03$) by leupeptin (Figure 1b). Neuronal cell death could not be responsible for the increase of tau secretion as indicated by the percentage of cell viability that was 99.77 ± 0.04 and 99.52 ± 0.08 for control and treated neurons respectively ($n = 6$).

Highest levels of tau secretion is observed when EBSS and leupeptin treatments are superimposed

In neurodegenerative diseases, more than one insult can act on neurons. In the present study, starvation and inhibition of the lysosomal function were superimposed by incubating neurons in EBSS and leupeptin (E + L) for at least 3 hrs. In a previous study, this treatment was shown to result in an accumulation of AVs³⁵. In normal conditions, after their formation, autophagosomes are rapidly eliminated by their fusion with lysosomes^{32,37}. Leupeptin prevents the elimination of autophagosomes by inhibiting lysosomal function³⁵. To monitor the efficacy of our treatment, three approaches were used to visualize the accumulation of AVs. Firstly, we analyzed the amount of LC3-II by western blotting (Figure 2a). LC3-II was 2.81 ± 0.51 times higher in E + L treated neurons than in control neurons ($p = 0.017$). Secondly, the accumulation of AVs was monitored by RFP-LC3 (Figure 2c). The number of cells containing AVs was significantly higher for treated neurons than control neurons. Thirdly, the presence of AVs was confirmed by electron microscopy (Figure 2d). The morphology of AVs was similar to that described by Boland et al'08³⁵.

Interestingly, the pattern of tau secretion by E + L treated neurons was identical to that observed with EBSS treatment. Indeed, three tau-positive bands at 47, 52 and 57 kDa were found in the medium (Figure 1a). E + L treatment induced the most significant increase of tau secretion by cortical neurons in comparison to either EBSS or leupeptin alone as the amount

of total tau was ~ 8 times ($p = 0.0002$) higher in the medium of E + L treated neurons than in the medium of control neurons (Figure 1b). The amount of tau secreted by E + L treated neurons was not significantly different from that of EBSS treated neurons although it had the tendency to be higher. Starvation and inhibition of lysosomal function seem to have additive effects on tau secretion since the amount of tau released upon combination of these insults was very close to the sum of tau secretion generated by these individual treatments. The percentage of neurons taking up trypan blue was evaluated to be less than 1% for both control and treated neurons and was not significantly different between these two groups ($p = 0.083$) indicating that tau was not released by dying neurons in the medium of E + L treated neurons. To eliminate the possibility that the increase of tau in the culture medium was caused by cell damage induced by the treatments, we measured the amount of lactate dehydrogenase (LDH) activity, a marker of cell membrane integrity, in the culture medium³⁸. The LDH was increased ~ 1.22 ($p = 0.0124$), 1.08 ($p = 0.0172$) and 1.19 ($p = 0.0095$) times in the medium of EBSS, leupeptin and E + L treated neurons, respectively, compared to the amount in the medium of control neurons revealing that cell membrane integrity was changed by our treatments (Figure 1c). This indicated that changes of membrane permeabilization could be responsible for the increased release of tau in the medium. However, the increase of LDH in the culture medium was not statistically different between the treatments ($p = 0.1453$) whereas tau secretion was indicating that changes in cell membrane integrity could not be the sole factor contributing to the increased release of tau (Figure 1c). Collectively, the above observations indicated that one pool of tau could be released by changes of the cell membrane integrity and another pool by a specific process of secretion.

In primary cortical neurons, we could confirm that E + L treatment induced an accumulation of AVs. Since we observed an important increase of tau secretion upon the accumulation of AVs by E + L treatment, one could speculate that these structures contributed to the release of tau. Indeed, recent studies reported that autophagosomes were involved in unconventional secretion³⁹. To verify this possibility, we examined whether tau was enriched in AVs in E + L treated neurons (Figure 3). AVs were visualized by transfecting neurons with RFP-LC3 as described in Figure 2. In most control neurons, RFP-LC3 presented a diffuse staining in the cell body and neurites whereas tau was mainly enriched in the neurites as revealed by the anti-tau antibody A0024 (Figure 3a). In E + L treated neurons, several RFP-

LC3 positive AVs were observed in the cell body and neurites but no enrichment of tau was noted in these structures. As illustrated in Figure 3b, tau staining was not concentrated in AVs in the cell body. Tau staining was observed in axonal swellings containing AVs (Figure 3b, arrow). However, tau staining was not enriched in the AVs. Similarly, no enrichment of tau staining was noted in AVs formed in neurites (Figure 3c).

Dephosphorylated tau species were secreted by EBSS and E + L treated neurons

The presence of a tau-positive band migrating at 47 kDa in the culture medium of EBSS and E + L treated neurons indicated that these treatments might have induced dephosphorylation of secreted tau. To verify this point, we examined the phosphorylation state of tau secreted by control and treated neurons (Figure 4a). As previously reported, tau found in the medium of control neurons was detected by the antibody Tau-1, an antibody directed against unphosphorylated tau²⁵. In the medium of neurons treated with EBSS and E + L, the bands at 52 kDa and 47 kDa were immunoreactive to the antibody Tau-1 but not the band at 57 kDa. The low amount of this band could not account for its absence of detection by Tau-1. Indeed, this antibody could detect the low amount of tau present in the medium in normal conditions. The amount of Tau-1-positive tau in the medium of E + L treated neurons was ~9 times ($p = 0.0016$) higher than in the medium of control neurons (Figure 4b). The above results revealed that EBSS and E + L treated neurons secreted two pools of tau, one Tau-1 positive and one Tau-1 negative. No increase of Tau-1 staining was noted for tau secreted by neurons treated with leupeptin. Secreted tau was not detectable with the phospho-tau antibodies (pS214, pT217 and pS422) indicating that its phosphorylation was very low (data not shown).

Dephosphorylation of tau by EBSS and E + L treatment

We then verified whether tau dephosphorylation by E + L treatment occurred before it was secreted by examining its phosphorylation in the cell lysate. Total tau staining revealed an important decrease of the band at 57 kDa and the presence of an additional band at 47 kDa in the cell lysate of treated neurons (Figure 4c). An additional weak band located between 52 and 57 kDa was also noted. To verify if tau was dephosphorylated in E + L treated neurons, the cell lysate was stained with the Tau-1 antibody (Figure 4c). In control neurons, this antibody mainly detected the band at 52 kDa whereas in treated neurons, it strongly revealed the bands located at 52 kDa and 47 kDa showing that tau found in these bands was importantly

dephosphorylated. We then examined whether tau dephosphorylation was induced by either EBSS or leupeptin. In neurons incubated in EBSS, the levels of tau dephosphorylation were very similar to those noted in E + L treated neurons whereas no tau dephosphorylation was observed upon leupeptin treatment as revealed by the Tau-1 antibody staining (Figure 4c). It is interesting to note that the band at 57 kDa that was barely detectable in cell lysate was present in the culture medium of treated neurons indicating that tau present in this band was importantly released by treated neurons (Figures 1a and 4c).

We further characterized the pattern of tau dephosphorylation in the lysate of E + L treated neurons since this treatment had the most important effects on tau secretion. The bands positive to the Tau-1 antibody were less immunoreactive to the phospho-specific anti-tau antibodies in treated neurons than in control neurons (Figure 5a). Interestingly, the antibody detecting tau phosphorylated at T181 was the sole phospho-specific anti-tau antibody that could detect the band at 47 kDa (Figure 5a). No phospho-specific anti-tau antibody could detect the band at 57 kDa in the cell lysate of treated neurons. This could be explained by its low levels in the cell lysate. The signal of the Tau-1 antibody was 3.75 ± 0.54 times higher in the cell lysate of E + L treated neurons than in the lysate of control neurons ($p = 0.0010$) but the decrease of the phospho-tau antibodies was not statistically different (Figure 5b).

The above results showed that E + L treatment resulted in tau dephosphorylation. To further demonstrate that tau gel mobility shift observed in E + L treated neurons was mainly caused by its dephosphorylation, an *in vitro* dephosphorylation assay was used. Cell lysates from control neurons were incubated with lambda protein phosphatase. Then, the pattern of tau-positive bands was analyzed by western blotting. As expected, when tau was dephosphorylated in the lysate of control cells, the pattern of tau-positive bands was reminiscent to that observed in neurons treated with E + L indicating that dephosphorylation contributed to the increased gel mobility of tau (Figure 5c). In contrast, when the cell lysate of treated neurons was dephosphorylated *in vitro*, no further tau gel mobility shift was noted indicating that tau was already dephosphorylated by the E + L treatment (Figure 5c). From the above results, it appeared that tau secretion was enhanced in conditions where its dephosphorylation was increased. It remains to be determined whether dephosphorylation favors tau secretion by neurons.

Discussion

In the present study, we demonstrated that tau secretion by primary cortical neurons is increased upon insults. Both starvation and inhibition of lysosomal function resulted in an increased secretion of tau. However, the most dramatic effect was noted when both insults were superimposed. Interestingly, the pattern of tau secretion varied depending on the insult. Upon leupeptin treatment only one tau-positive band was released as noted for control neurons whereas neurons treated with either EBSS or E + L secreted three tau-positive bands. Furthermore, in all conditions tested, a pool of secreted tau was dephosphorylated at the Tau-1 antibody epitope. All together, our observations indicate that insults such as nutrient deprivation and lysosomal dysfunction known to take place in neurodegenerative diseases could increase tau secretion and thereby the propagation of tau pathology in the brain.

The fact that the percentage of cell viability between control and treated neurons was not statistically different indicated that tau was not released in the culture medium by dying neurons upon insults. However, we noted an increase of LDH in the culture medium revealing changes of cell membrane integrity in treated neurons. This indicated that tau could be released by an increase of membrane permeabilization³⁸. Although we cannot rule out this possibility, our data indicate that it would not be the sole mechanism responsible for the increase of tau in the culture medium. Indeed, the increase of LDH in the culture medium was not statistically different between the treatments indicating that changes of cell membrane integrity were similar in all the treatments. On the other hand, the increase of tau secretion between E + L and leupeptin and EBSS and leupeptin was statistically different. Based on the above data, we concluded that tau could be released by both changes of membrane permeabilization and a specific process of secretion when neurons were treated with EBSS and E + L. According to a recent study, the release of LDH could be secondary to the extracellular accumulation of tau³⁸. In this study, it was shown that extracellular tau oligomers can form pores allowing LDH to escape from the cytoplasm to the medium. If LDH was released in the medium by tau-induced pores in our experimental conditions, it would signify that tau was primarily released in the medium by a specific secretory process. This possibility remains to be demonstrated since we were not successful in demonstrating that tau released by treated neurons was oligomeric (data not shown).

Starvation exerted a dramatic effect on tau secretion by primary cortical neurons. This

could signify that tau is secreted by membranous structures that are present and accumulate in this condition. During starvation, there is an extreme induction of autophagy characterized by the accumulation of AVs³². Autophagosomes were shown to participate in unconventional secretion³⁹. In the present experimental conditions, AVs might not contribute to the increase of tau secretion since tau was not enriched in these structures. The increase of tau secretion by E + L treatment was higher than that induced by starvation alone although the difference between these two treatments was not statistically significant. The main difference between EBSS and E + L treatments is that in EBSS but not in E + L treated neurons, the autophagic flux was complete. Indeed, in a previous study, it was reported that when neurons were treated with EBSS and leupeptin, AVs were filled with material whereas upon treatment with EBSS alone, neurons presented empty AVs as expected after their fusion with functional lysosomes³⁵. The present results indicate that complete autophagic flux is not necessary to induce a significant increase of tau secretion by starved neurons. The fact that tau was not enriched in AVs and that the inhibition of autophagic flux did have a major impact of tau secretion could indicate that the increase of tau release by EBSS and E + L treated neurons was not linked to the induction of autophagy but rather to starvation per se. For example, important alterations of signaling and membrane trafficking are observed in starved cells. These changes could enhance the interaction of tau with proteins and/or membranous structures involved in its secretion.

The inhibition of lysosomal function by leupeptin resulted in a modest increase of tau secretion. Lysosomes were shown to be able to fuse with the plasma membrane to release their content in the extracellular space⁴⁰. It is known that tau can be degraded in lysosomes^{41,42}. Therefore, it is possible that inhibition of cathepsins by leupeptin resulted in less degradation of tau and this would in turn increase the amount of tau that could be released by lysosome exocytosis. An endo-lysosomal secretory pathway has also been reported where lysosomes fuse with endosomes before their fusion with the plasma membrane⁴³. In such a case, extracellular tau that has been endocytosed could be found in lysosomes after their fusion with tau-containing endosomes. The highest levels of tau secretion were observed when both starvation and inhibition of lysosomal function were superimposed. These two conditions seem to act in parallel to increase tau secretion since the amount of tau released by E + L treated neurons was very close to that obtained when the amounts of each treatment were

added. All together, our results indicate that tau can be released by several pathways, which by acting in parallel, can result in an important increase of tau secretion in pathological conditions.

Upon starvation, three tau-positive bands were noted in the culture medium. The release of different tau species by this treatment could indicate that more than one secretory pathways are involved in tau secretion in this condition. Tau seems to be secreted by unconventional secretory pathways as noted for other proteins involved in neurodegenerative diseases^{12,14,18,26,27}. Several unconventional secretory pathways exist and therefore different tau species might have access to distinct pathways⁸. Furthermore, several studies including ours have reported that two pools of tau, a cytosolic and membranous one are present in neurons⁴⁴⁻⁴⁷. Each of these pools could have access to different secretory pathways in starved neurons. The tau species released upon starvation differed by their phosphorylation state. Phosphorylation of tau was shown to regulate its association with the membranes. In a recent study, it was reported that dephosphorylated tau was associated with the plasma membrane⁴⁶. In our previous study, we showed that hyperphosphorylated tau and tau dephosphorylated at the epitope of Tau-1 were not found in the same membranous subfractions in AD brain⁴⁵. Hyperphosphorylated and dephosphorylated tau at the Tau-1 epitope were found in the subfraction enriched in ER membranes and in the Golgi membranes respectively. The differential association of hyperphosphorylated and hypophosphorylated tau with membranes could give them access to distinct secretory pathways more or less efficient in releasing tau.

Upon starvation, tau dephosphorylation most likely occurred before secretion since in the cell lysate, we noted an important decrease of tau phosphorylation at several sites accompanied by an increased immunoreactivity of tau to the Tau-1 antibody. The dephosphorylation of tau by starvation was unexpected. However, this phenomenon is not unique to this pathology since other insults were reported to induce a decrease of tau phosphorylation. Oxidative stress induced by hydrogen peroxide treatment caused a dephosphorylation of tau in primary cortical neurons⁴⁸. Excitotoxicity induced by homocysteine that activates both glutamate receptors and phosphatase 2A resulted in tau dephosphorylation in cerebellar granule cells⁴⁹. Other insults such as hypoxia and glucose deprivation were also reported to induce a decrease of tau phosphorylation in both rat and human brain slices⁵⁰. Dephosphorylation of tau was also reported *in vivo* during ischemia in

both brain and spinal cord^{51,52,53}. Interestingly, our previous study revealed that at an advanced stage of AD, both hyperphosphorylated and hypophosphorylated tau are present⁴⁵. A pool of dephosphorylated tau at the epitope recognized by the Tau-1 antibody was also observed by another group in AD brain⁵⁴. Collectively the above observations indicate that some of the above insults could be responsible for the generation of hypophosphorylated tau whereas other insults such as the accumulation of A β could be responsible for the increase of hyperphosphorylated tau in AD brain⁵⁵⁻⁵⁸. In normal conditions, it is still unclear whether tau was dephosphorylated before secretion. A dephosphorylated pool of tau at the Tau-1 antibody epitope was detected in the cell lysate prepared from control neurons and therefore it is possible that this pool was secreted. On the other hand, phosphatases located along tau secretory pathway could contribute to tau dephosphorylation. For example, the phosphatase tissue non-specific alkaline phosphatases (TNAP) present in the plasma membrane were shown to be responsible for the dephosphorylation of extracellular tau⁵⁹. Upon starvation, a tau-positive band located at 57 kDa was observed in the medium. Interestingly, this band was not immunoreactive to the Tau-1 antibody showing that tau contained in this band was not significantly dephosphorylated at this epitope. Our results demonstrated that both phosphorylated and hypophosphorylated tau can be released by primary cortical neurons but the amount of each of these pools of tau varied depending on the insult and thereby could be used as an indication of neuronal injury.

In two recent studies, it was reported that in physiological conditions, tau secreted by primary cortical neurons was dephosphorylated at the Tau-1 epitope^{16,25}. In all conditions that were tested in the present study, a pool of secreted tau was dephosphorylated at the Tau-1 antibody epitope. All Tau-1 positive bands detected in the cell lysate were found in the medium in both control and treated neurons. It remains to be determined whether dephosphorylated tau was preferentially secreted by primary cortical neurons. Upon starvation, the proportion of the bands at 52 and 47 kDa was similar in both the cell lysate and medium indicating that the most dephosphorylated tau species were not more secreted than the less dephosphorylated ones. The fact that hypophosphorylated tau was secreted by control and treated neurons could indicate that mechanisms are present by these cells to eliminate toxic proteins, their secretion being one of them. Indeed, intracellular hypophosphorylated tau was reported to induce apoptosis when it was overexpressed in non-neuronal cells⁶⁰.

Hypophosphorylated tau was also shown to be toxic in *Drosophila*⁶¹. In this model, the toxicity of hypophosphorylated tau was correlated to the impairment of axonal transport. Interestingly, extracellular hypophosphorylated tau was also shown to be toxic. In a previous study, extracellular hypophosphorylated tau was reported to induce a sustained increase of intracellular calcium by the activation of the muscarinic M1 and M3 receptors leading to cell death^{59,62}. The present study indicates that upon insults, the increased release of hypophosphorylated tau could benefit to neurons to prevent apoptosis. On the other hand, this release could compromise neuronal survival by its extracellular toxicity.

It remains unclear whether phosphorylation regulates tau secretion since both phosphorylated and unphosphorylated tau species were detected extracellularly. In HeLa cells, we reported that a tau mutant mimicking phosphorylation was more secreted than one mimicking dephosphorylation¹². Tau secreted by exosomes was shown to be phosphorylated at several sites found in AD¹⁸. In normal conditions, primary cortical neurons were shown to release unphosphorylated tau²⁵. However, in the present study, we report that several tau species were secreted some phosphorylated and other unphosphorylated by cortical neurons upon insults. Collectively, the above observations indicate that phosphorylation per se might not be the determinant factor regulating tau secretion but rather the cellular context which influences both tau phosphorylation and tau access to secretory pathways.

Tau secretory pathways in primary cortical neurons remain to be identified. However, our data showed that this cellular system is suitable to examine these pathways in physiological conditions and upon insults. The distinct pattern of secreted tau species by insults and the additive effects of these insults on tau secretion when they are combined indicate that tau might be secreted by several pathways as noted for other proteins involved in neurodegenerative diseases⁶³⁻⁶⁶. It is still unknown whether the different tau species that are released exert distinct toxic effects and/or whether they contribute distinctly to the propagation of tau pathology in the brain. It is crucial to unravel the distinct contribution of tau species to these events to develop therapeutic strategies to prevent neuronal dysfunction and to abrogate the spreading of tau pathology in AD brain.

Acknowledgements

The authors would like to thank Michel Lauzon for his valuable technical assistance for the electron microscopy and Miguel Chagnon for his help for the statistical analysis. We would like to thank Diane Gingras for helpful discussion. The authors would also like to thank Dr. T. Yoshimori for the construct RFP-LC3 obtained from Addgene. This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (MOP-114874) (NL) and an FRSQ infrastructure grant to the Groupe de Recherche sur le système nerveux central (GRSNC) (NL). N-V M has a studentship from the GRSNC. G. R.-L. has a post-doctoral fellowship from the GRSNC.

Author information

Affiliations

Département de Neurosciences, Université de Montréal, C.P.6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Nguyen-Vi Mohamed, Vanessa Plouffe, Gaudeline Rémillard-Labrosse & Nicole Leclerc
Centre Hospitalier de l'Université Laval, Neurosciences, RC-9800, 2705 Boulevard Laurier Québec (QC), Canada, G1V 4G2

Emmanuel Planel

Contributions

N.-V.M. was involved in all the experiments included in the present study and prepared figures 1, 2, 3, 4 and 5. V.P. performed tau immunoprecipitation for figures 1 and 4 and analyzed the results presented in figure 5A and B. G.R.-L. performed the morphological analysis for figure 2C and participated to the analysis of the results included in figure 5A and B.N.L. wrote the paper. E.P. was involved in the in vitro dephosphorylation assay. All the authors reviewed the paper.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Corresponding author

Correspondence to Nicole Leclerc.

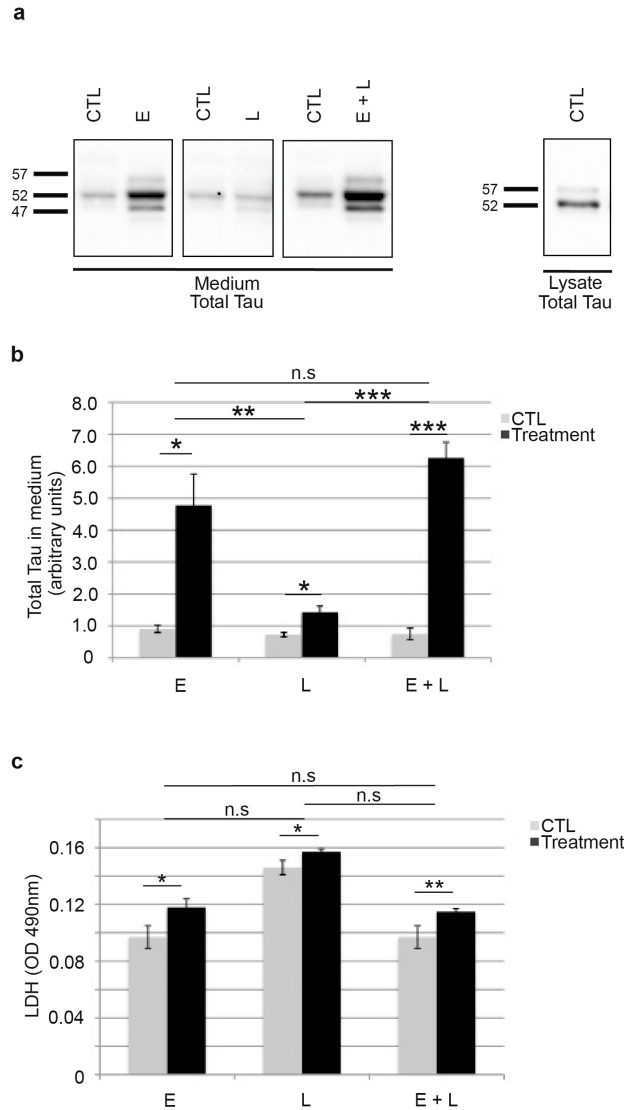


Figure 1 | EBSS, leupeptin and EBSS+leupeptin increased the secretion of endogenous tau by primary cortical neurons. (a) In normal conditions (CTL), one tau-positive band at 52 kDa was detected in the culture medium by an antibody revealing total tau (A0024). A similar pattern was observed when neurons were treated with leupeptin (L). When neurons were treated either with EBSS (E) or EBSS+leupeptin (E+L), three tau-positive bands at 47, 52 and 57 kDa were detected in the culture medium. In the cell lysate of control neurons, two tau-positive bands at 52 and 57 kDa were revealed by the anti-tau antibody A0024 (n=6). (b) Quantification of total tau in culture medium by densitometry upon EBSS, leupeptin and E+L treatments (n=6). The intensities of the bands were expressed in arbitrary units. Values represent mean \pm s.e.m.; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. (c) Cell damage was evaluated by measuring the amount of LDH released in the culture medium (n = 6). Since control and treated neurons were not incubated in the same medium, the amount of LDH in the EBSS treatment was compared to that of EBSS without cell. The amount of LDH in the leupeptin treatment was compared to that of neurobasal medium without cell. The increase of LDH in the medium was not statistically different (n.s) between the treatments. Values represent mean \pm s.e.m.; *p < 0.05; **p < 0.01. Blots used in this figure were cropped. Full-length blots were included in supplementary figure 1.

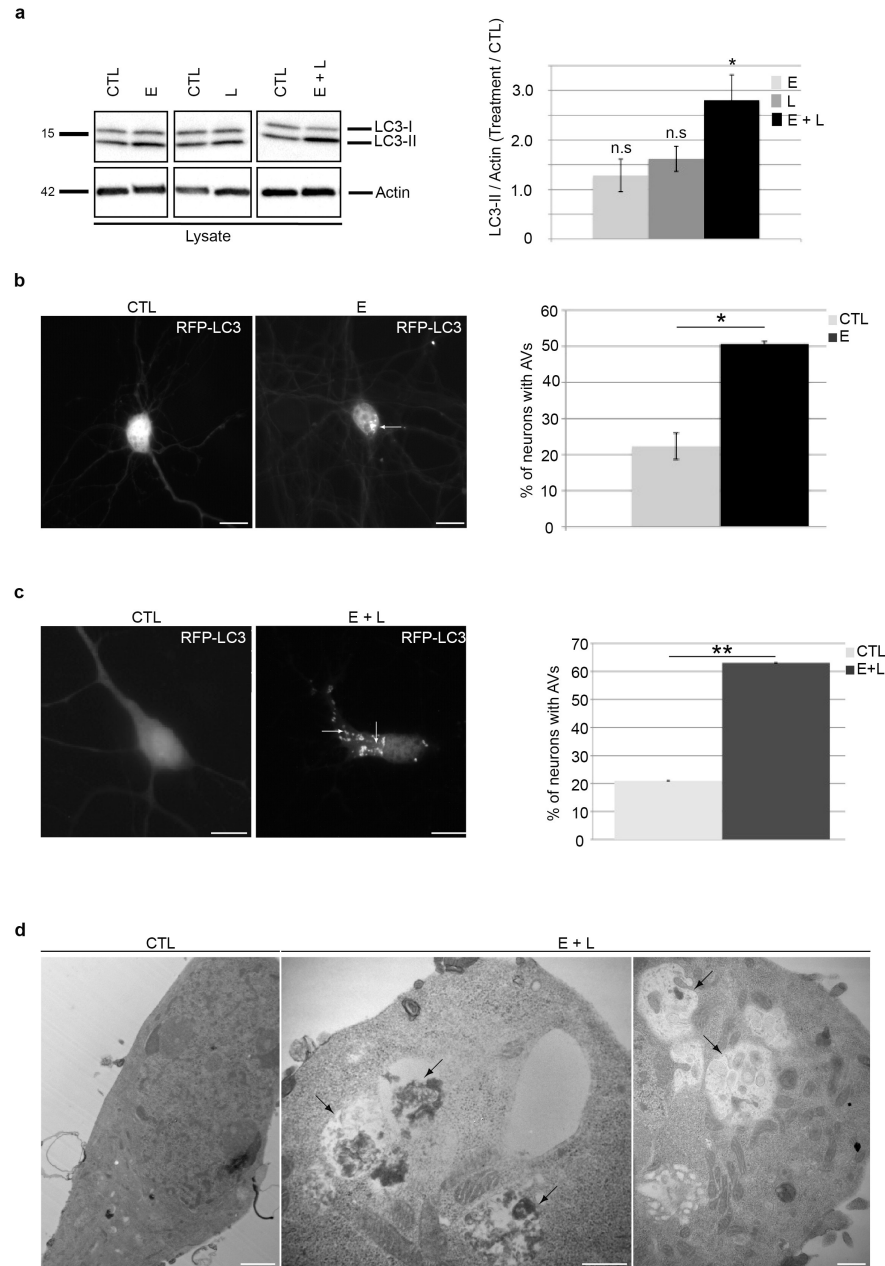


Figure 2 | EBSS and E+L treatments induced AVs in primary cortical neurons. (a) LC3-II was analyzed by western blotting in the cell lysate prepared from EBSS (E), leupeptin (L) and EBSS+ leupeptin (E+L) treated neurons. The LC3-II levels were compared to those of actin. For the analysis of LC3-II, 10 mg of cell lysate were loaded (n=6). Values represent mean±s.e.m.; *p<0.05. (b) Control (CTL) and EBSS treated neurons were transfected with RFP-LC3 to monitor the formation of AVs (arrows) (n=3). Scale bar=10 μm. The number of cells containing AVs in treated neurons was significantly higher than in control neurons (n=3). Values represent mean ±s.e.m.; *p<0.05. (c) Control and E+L treated neurons were transfected with RFP-LC3 to monitor the formation of AVs (arrows) (n=4). Scale bar=10 μm. The number of cells containing AVs in treated neurons was significantly higher than in control neurons (n=4). Values represent mean±s.e.m.; **p<0.01. (d) The formation of AVs in the cell body and neurites of neurons was confirmed by electron microscopy (arrows). AVs contained electron-dense material. Scale bar=2 μm for left panel and 500 nm for middle and right panels. Magnification=5800x for left panel and 25 000x for middle and right panels.

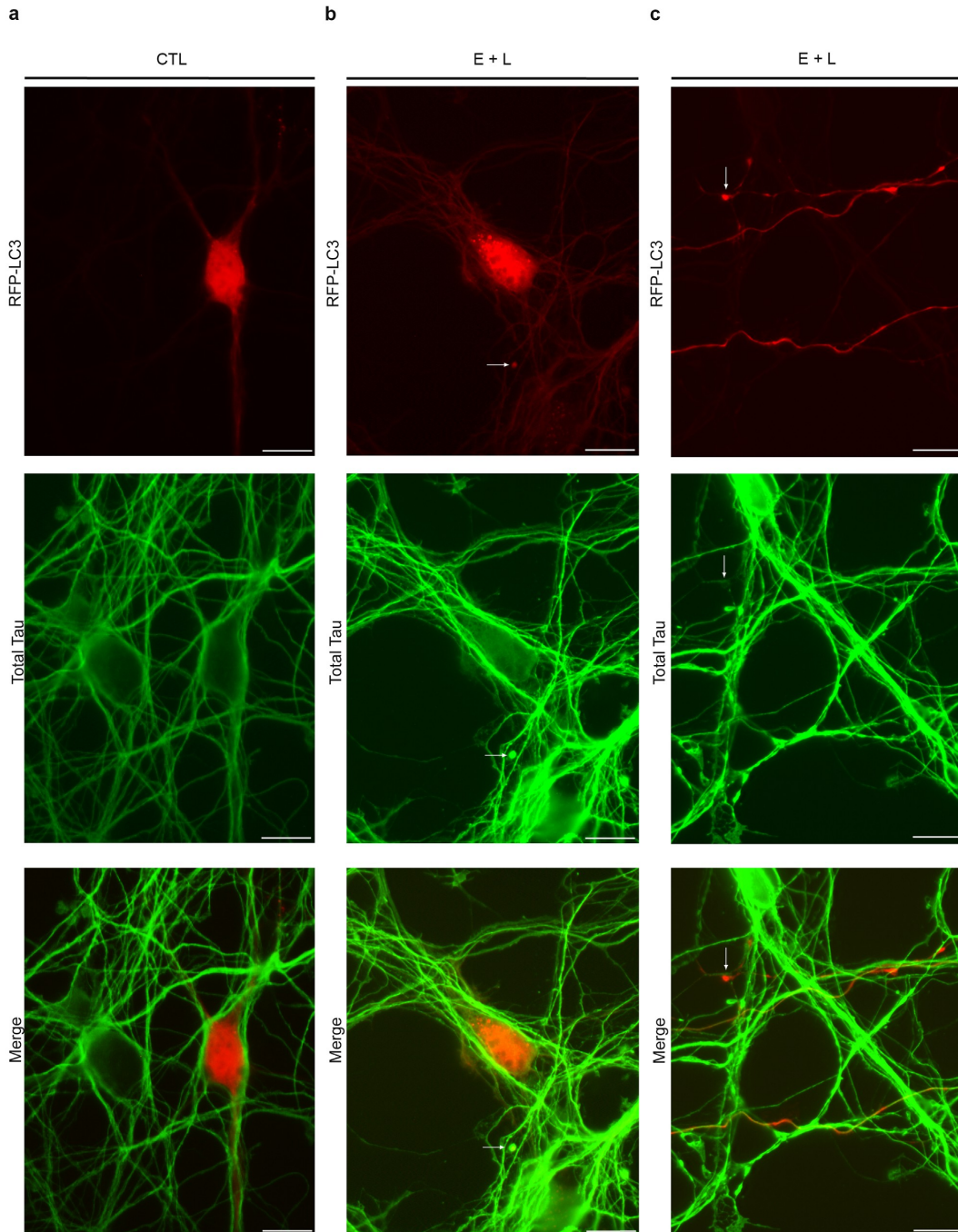


Figure 3 | Tau was not enriched in AVs found in E+L treated neurons. Control and E+L treated neurons transfected with RFP-LC3 were fixed and stained with an antibody directed against total tau (Green). (a) Control neurons transfected with RFP-LC3. (b) Presence of several AVs in the cell body of E+L treated neurons as revealed by RFP-LC3. No enrichment of tau was noted in RFP-LC3-positive structures in the cell body and neurites (arrow) of E+L treated neurons ($n=7$). (c) Tau staining was not enriched in a RFP-LC3-positive structure (arrow) found in a neurite of E+L treated neurons. Scale bar = 10 μm .

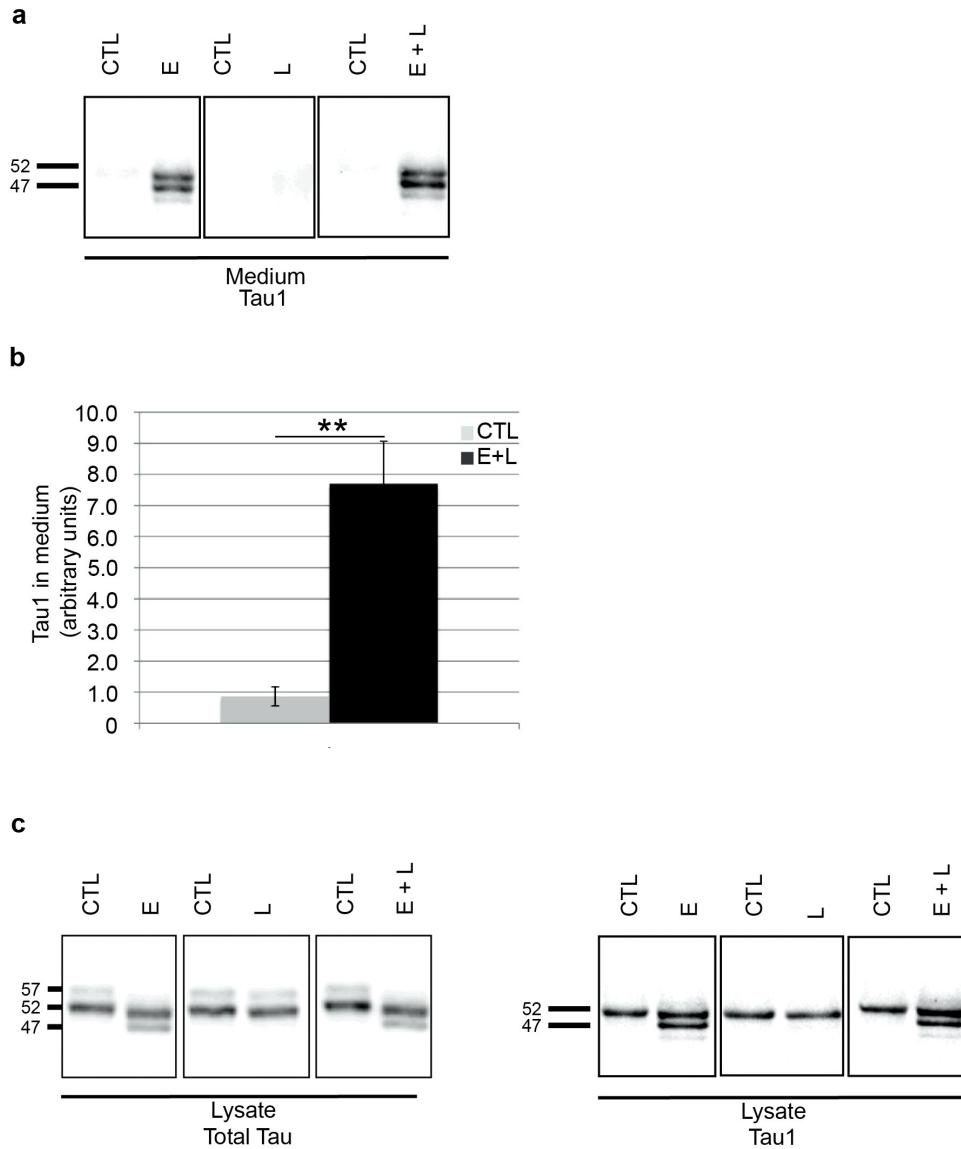


Figure 4 | Significant increased secretion of dephosphorylated tau by EBSS and E+L treatments. (a) In the culture medium of control neurons (CTL) and leupeptin treated neurons (L), only one tau-positive band at 52 kDa was detected with the Tau-1 antibody. In the medium of EBSS (E) and E+L treated neurons, the bands at 47 and 52 kDa but not the one at 57 kDa were detected with this antibody (n=6). (b) Quantification by densitometry of tau dephosphorylated at the Tau-1 antibody epitope in culture medium of control and E+L treated neurons (n=11). The intensities of the bands were expressed in arbitrary units. Values represent mean \pm s.e.m.; **p<0.01 (c) In the cell lysate of EBSS and E+L treated neurons, an important decrease of the band at 57 kDa and the apparition of a band at 47 kDa were revealed by the antibody A0024 (n=13). An additional weak band was also observed between 52 and 57 kDa. In the cell lysate of EBSS and E+L treated neurons, the bands at 52 and 47 kDa were highly immunoreactive to the Tau-1 antibody whereas only the band at 52 kDa was detected in the cell lysate of control and leupeptin treated neurons (n=11). Blots used in this figure were cropped. Full-length blots were included in supplementary figure 2. A higher exposure time of panel (a) was included in supplementary figure 3 for better detection of tau signal in the medium of control neurons.

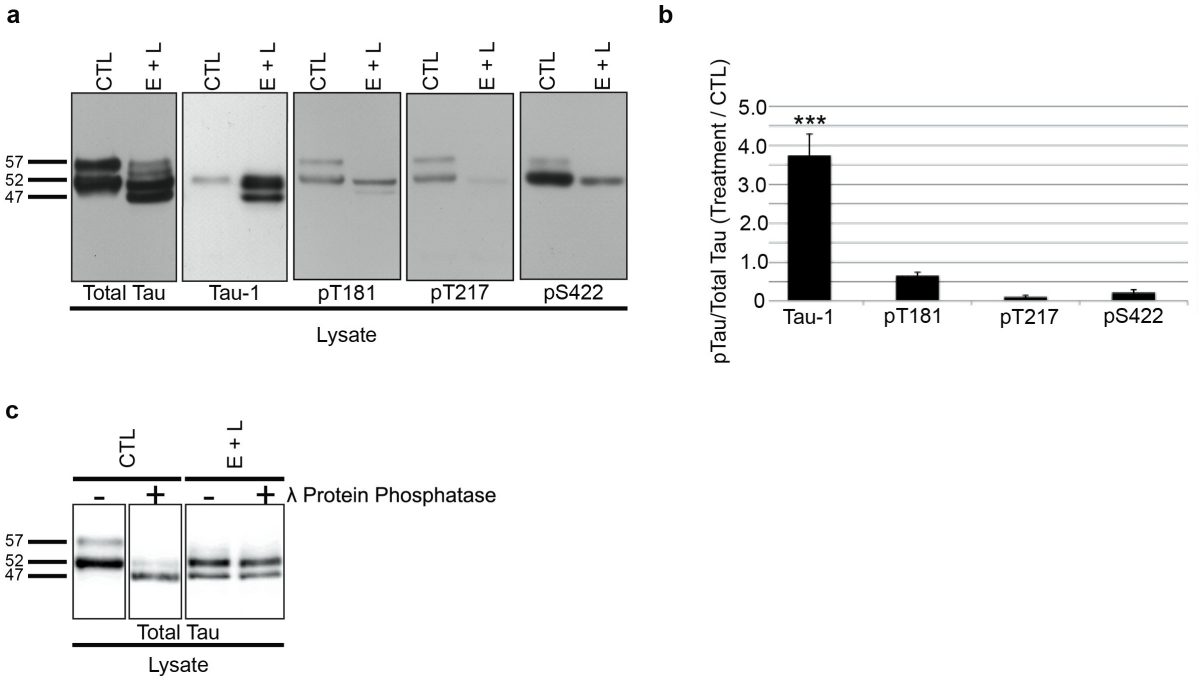


Figure 5 | Dephosphorylation of tau by E+L treatment. (a) The bands positive to tau-1 antibody were less immunoreactive to the phospho-tau antibodies in the cell lysate of E+L treated neurons (n=3) (b) Quantification of tau detected by Tau-1 and phospho-specific tau antibodies in the cell lysate of E+L treated and control neurons. Values represent mean±s.e.m.; ***p<0.001. (c) Incubation of the cell lysates from control neurons with lambda (λ) protein phosphatase resulted in an increase of tau gel mobility reminiscent to that observed in E+L treated neurons. No further increase of tau gel mobility was observed when the cell lysate of E+L treated neurons was incubated with λ protein phosphatase (n=3). Blots used in this figure were cropped. Full-length blots were included in supplementary figure 2.

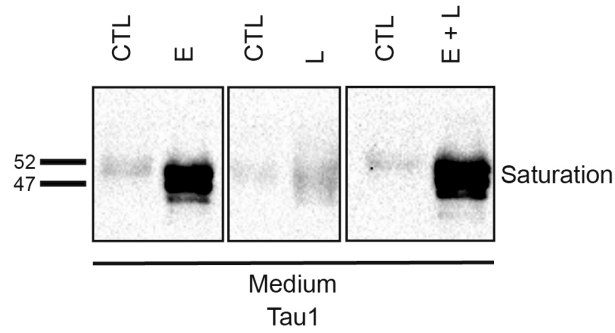


Figure legend of supplementary figure1 : Detection of a tau-positive band by Tau-1 antibody in the medium of control neurons. This figure contains the western blot presented in Figure 4a that was exposed for a longer time to better reveal the tau-positive bands detected the anti-tau antibody Tau-1 in the medium of control neurons (CTL). One tau-positive band at 52 kDa was detected with the Tau-1 antibody(n=6).

References

1. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J 106unn chem* 261, 6084–6089 (1986).
2. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4913–4917 (1986).
3. Braak, H. & Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259 (1991).
4. Morris, M., Maeda, S., Vossel, K. & Mucke, L. The many faces of tau. *Neuron* 70, 410–426 (2011).
5. Brundin, P., Melki, R. & Kopito, R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 301–307 (2010).
6. Frost, B. & Diamond, M. I. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 11, 155–159 (2010).
7. Walker, L. C., Diamond, M. I., Duff, K. E. & Hyman, B. T. Mechanisms of Protein Seeding in Neurodegenerative Diseases. *Arch Neurol* 1–7 (2012).
8. Mohamed, N. V., Herrou, T., Plouffe, V., Piperno, N. & Leclerc, N. Spreading of tau pathology in Alzheimer’s disease by cell-to-cell transmission. *Eur J Neurosci* 37, 1939–1948 (2013).
9. Kim, W., Lee, S. & Hall, G. F. Secretion of human tau fragments resembling CSF- tau in Alzheimer’s disease is modulated by the presence of the exon 2 insert. *FEBS Lett* 584, 3085–3088 (2010).
10. Kim, W. *et al.* Interneuronal transfer of human tau between Lamprey central neurons in situ. *J Alzheimers Dis* 19, 647–664 (2010).
11. Avila, J. *et al.* Looking for novel functions of tau. *Biochem Soc trans* 40, 653–655 (2012).
12. Plouffe, V. *et al.* Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PloS One* 7, e36873 (2012).
13. Yamada, K. *et al.* In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *J Neurosci* 31, 13110–13117 (2011).
14. Chai, X., Dage, J. L. & Citron, M. Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol Dis* 48, 356–366 (2012).
15. Wu, J. W. *et al.* Small misfolded tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J 106unn chem* 288, 1856–1870 (2012).
16. Karch, C. M., Jeng, A. T. & Goate, A. M. Extracellular tau levels are influenced by variability in tau that is associated with tauopathies. *J 106unn chem* 287, 42751–42762 (2012).
17. Kfoury, N., Holmes, B. B., Jiang, H., Holtzman, D. M. & Diamond, M. I. Trans- cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J 106unn chem* 287, 19440–19451 (2012).
18. Saman, S. *et al.* Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is

- selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J 107unn chem* 287, 3842–3849 (2012).
19. Clavaguera, F. *et al.* Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11, 909–913 (2009).
 20. Frost, B., Jacks, R. L. & Diamond, M. I. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J 107unn chem* 284, 12845–12852 (2009).
 21. Guo, J. L. & Lee, V. M. Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J 107unn chem* 286, 15317–15331 (2011).
 22. de Calignon, A. *et al.* Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron* 73, 685–697 (2012).
 23. Liu, L. *et al.* Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PloS One* 7, e31302 (2012).
 24. Barten, D. M. *et al.* Tau transgenic mice as models for cerebrospinal fluid tau biomarkers. *J Alzheimers Dis* 24 Suppl 2, 127–141 (2011).
 25. Pooler, A. M., Phillips, E. C., Lau, D. H., Noble, W. & Hanger, D. P. Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO reports* 14, 389–394 (2013).
 26. Simon, D. *et al.* Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener Dis* 10, 73–75 (2012).
 27. Simon, D., Garcia-Garcia, E., Royo, F., Falcon-Perez, J. M. & Avila, J. Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett* 586, 47–54 (2012).
 28. Saraste, J., Palade, G. E. & Farquhar, M. G. Temperature-sensitive steps in the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 6425–6429 (1986).
 29. Hampel, H. *et al.* Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 45, 30–40 (2010).
 30. Kimura, S., Noda, T. & Yoshimori, T. Dissection of the 107unneling107omes maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3, 452–460 (2007).
 31. Madeira, A., Pomet, J. M., Prochiantz, A. & Allinquant, B. SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. *FASEB J* 19, 1905–1907 (2005).
 32. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544 (2012)
 33. Luft, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 409–414 (1961).
 34. Allen, S. J., Watson, J. J. & Dawbarn, D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 9, 559–573 (2011).
 35. Boland, B. *et al.* Autophagy induction and 107unneling107omes clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28, 6926–6937 (2008).
 36. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic

- mice expressing a fluorescent tunneling108omes marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101–1111 (2004).
37. Nixon, R. A. *et al.* Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an 108unnel-electron microscopy study. *J neuropathol exp neurol* 64, 113–122 (2005).
 38. Flach, K. *et al.* Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. *J 108unn chem* 287, 43223–43233 (2012).
 39. Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F. & Malhotra, V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J cell 108unn* 188, 527–536 (2010).
 40. Andrei, C. *et al.* The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 10, 1463–1475 (1999).
 41. Wang, Y. *et al.* Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet* 18, 4153–4170 (2009).
 42. Kruger, U., Wang, Y., Kumar, S. & Mandelkow, E. M. Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. *Neurobiol Aging* 33, 2291–2305 (2012).
 43. Laulagnier, K. *et al.* Role of AP1 and Gadkin in the traffic of secretory endolysosomes. *Mol Biol Cell* 22, 2068–2082 (2011).
 44. Farah, C. *et al.* Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 710–724 (2006).
 45. Perreault, S., Bousquet, O., Lauzon, M., Paiement, J. & Leclerc, N. Increased association between rough endoplasmic reticulum membranes and mitochondria in transgenic mice that express P301L tau. *J neuropathol exp neurol* 68, 503–514 (2009).
 46. Pooler, A. M. *et al.* Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiol Aging* 33, 431 e427–438 (2012).
 47. Brandt, R., Léger, J. & Lee, G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J cell 108unn* 131, 1327–1340 (1995).
 48. Davis, D. R., Anderton, B. H., Brion, J. P., Reynolds, C. H. & Hanger, D. P. Oxidative stress induces dephosphorylation of tau in rat brain primary neuronal cultures. *J neurochem* 68, 1590–1597 (1997).
 49. Kuszczyk, M., Gordon-Krajcer, W. & Lazarewicz, J. W. Homocysteine-induced acute excitotoxicity in cerebellar granule cells in vitro is accompanied by PP2A-mediated dephosphorylation of tau. *Neurochem Int* 55, 174–180 (2009).
 50. Burkhart, K. K., Beard, D. C., Lehman, R. A. & Billingsley, M. L. Alterations in tau phosphorylation in rat and human neocortical brain slices following hypoxia and glucose deprivation. *Exp Neurol* 154, 464–472 (1998).
 51. Mailliot, C. *et al.* Rapid tau protein dephosphorylation and differential rephosphorylation during cardiac arrest-induced cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 543–549 (2000).
 52. Shackelford, D. A. & Nelson, K. E. Changes in phosphorylation of tau during

- ischemia and reperfusion in the rabbit spinal cord. *J neurochem* 66, 286–295 (1996).
53. Shackelford, D. A. & Yeh, R. Y. Dephosphorylation of tau during transient forebrain ischemia in the rat. *Mol Chem Neuropathol* 34, 103–120 (1998).
 54. Kopke, E. *et al.* Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J 109unn chem* 268, 24374–24384 (1993).
 55. Götz, J. Tau and transgenic animal models. *Brain Res Brain Res Rev* 35, 266–286 (2001).
 56. Zheng, W. H., Bastianetto, S., Mennicken, F., Ma, W. & Kar, S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* 115, 201–211 (2002).
 57. Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E. & Mandelkow, E. M. Aβ oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 30, 11938–11950 (2010).
 58. Jin, M. *et al.* Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 5819–5824 (2011).
 59. Diaz-Hernandez, M. *et al.* Tissue non-specific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J 109unn chem* 285, 32539–32548 (2010).
 60. Liu, X. A. *et al.* Tau dephosphorylation potentiates apoptosis by mechanisms involving a failed dephosphorylation/activation of Bcl-2. *J Alzheimers Dis* 19, 953–962 (2010).
 61. Talmat-Amar, Y. *et al.* Important neuronal toxicity of microtubule-bound Tau in vivo in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 20, 3738–3745 (2011).
 62. Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M. T. & Avila, J. Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 37, 673–681 (2008).
 63. Urushitani, M. *et al.* Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 9, 108–118 (2006).
 64. Gomes, C., Keller, S., Altevogt, P. & Costa, J. Evidence for secretion of Cu,Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci 109un* 428, 43–46 (2007).
 65. Gousset, K. *et al.* Prions hijack tunneling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 11, 328–336 (2009).
 66. Fevrier, B. *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9683–9688 (2004).

IV. The Golgi fragmentation increases tau secretion

**N-V. MOHAMED et al, Soumis dans The Journal of Neuroscience en
Avril 2016**

Golgi fragmentation increases tau secretion

Nguyen-Vi Mohamed and Nicole Leclerc⁺

Département de Neurosciences, Université de Montréal, Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal Hospital (CRCHUM), Montréal, QC, Canada

Running title: Golgi apparatus and tau secretion

⁺Corresponding author: Dr. Nicole Leclerc, Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal Hospital (CRCHUM), Montréal, QC H2X 0A9, Canada, Telephone: [514\)890-8000 ext.31278](tel:5148908000), [FAX:\(514\)412-7936](tel:5144127936)

Keywords: Golgi apparatus; neuronal hyperexcitability; tau; secretion

ABSTRACT

Tau protein can be released by neurons, an event that is believed to lead to the propagation of tau pathology in Alzheimer's disease. However, the mechanisms involved in the release of tau remain to be characterized. In the present study, we demonstrate that the fragmentation of the Golgi apparatus enhances tau secretion in both primary cortical neurons and HeLa cells overexpressing human tau. Most importantly, neuronal hyperexcitability, a condition observed at early stages of Alzheimer's disease and previously shown to fragment the Golgi, increases tau secretion. This increase of tau secretion can be blocked by preventing the fragmentation of the Golgi through the inactivation of cdk5 in primary cortical neurons. In HeLa cells, the overexpression of Rab1A blocking the fragmentation of the Golgi decreases tau secretion whereas the suppression of Rab1A known to induce a fragmentation increases tau secretion. Collectively, the above data revealed that the Golgi apparatus is involved in tau secretion.

INTRODUCTION

Neurofibrillary tangles (NFTs) composed of misfolded aggregated tau protein propagate in a predictable manner in Alzheimer's disease (AD) [1-4]. It remains unclear how NFTs spread in human brain. A new concept has emerged that in several neurodegenerative diseases including AD, the spreading of misfolded protein aggregates would result from cell-to-cell transmission [5-7]. This implies that NFTs would propagate in the brain by the release of misfolded tau aggregates from an affected neuron followed by its uptake in neighboring neurons. Consistent with this, several studies demonstrated that tau can be secreted and endocytosed by neurons both in vitro and in vivo [8-21]. Most importantly, in a transgenic mouse model where human tau overexpression was restricted to the entorhinal cortex, the first region to be affected in AD, the spreading of tau pathology was observed along synaptically connected circuits [22,23]. More recently, it was reported that synaptic contacts favor cell-to-cell propagation of tau pathology [24]. Although the mechanisms of the trans-synaptic spreading of tau pathology remain elusive, secretion of tau by pre-synaptic neurons and its uptake by post-synaptic neurons appear as a plausible cascade of events underlying the propagation of tau pathology in the brain.

The mechanisms of tau secretion remain to be elucidated. The presence of tau in the interstitial fluid in tau transgenic mice brain as well as the presence of tau in the cerebrospinal fluid (CSF) of tau transgenic mice before neurodegeneration indicate that extracellular tau can be released by an active process of secretion in vivo [11,25]. In recent studies, tau was shown to be secreted by primary cortical neurons upon neuronal activity both in vitro and in vivo [26,27]. In vitro, human tau was secreted by several non-neuronal and neuronal cell lines when it was overexpressed [8,9,12,14]. As noted for other proteins involved in neurodegenerative diseases, tau seems to be released by unconventional secretory pathways [9,12,16,28-30].

Our previous data and recent data published by others indicate that the Golgi apparatus, involved in both conventional and unconventional secretion, could contribute to tau secretion. The Golgi located near to the nucleus is organized in stacks of flattened cisternae [31]. However, the Golgi apparatus is highly dynamic and can be fragmented under both physiological and pathological conditions [32,33]. Most interestingly, a fragmentation of the Golgi was noted at early stages of the several neurodegenerative diseases including AD [34-37]. Our previous studies indicate that tau could contribute to this fragmentation in AD as we noted a fragmentation of the Golgi in tau transgenic mice as well as upon human tau overexpression in primary hippocampal neurons [38]. Two recent studies reported that A β and neuronal hyperexcitability observed at early stages of both sporadic and familial AD and in AD mouse models induced a fragmentation of the Golgi [39-42]. A fragmentation of the Golgi can either increase or decrease secretion. The fragmentation induced by A β resulted in an increased transport of proteins from the Golgi to the plasma membrane [43]. Interestingly, A β was shown to enhance the propagation of tau pathology implying that it could increase tau secretion in vivo [44]. All the above observations and the fact that the Golgi is involved in unconventional secretion led us to examine whether its fragmentation regulates tau secretion. In the present study, the contribution of the Golgi fragmentation to tau secretion was investigated in both primary cortical neurons and Hela cells overexpressing human tau. In both cellular systems, the fragmentation of the Golgi was correlated to an increase of tau secretion whereas the prevention of this fragmentation resulted in a decrease of tau secretion.

RESULTS

Neuronal hyperexcitability increases tau secretion

It was previously reported that neurons present hyperexcitability at early stages of AD [39]. We examined whether tau secretion was affected by such a phenomenon. To explore this, primary cortical neurons were treated with either 10mM or 20 mM of potassium chloride (KCl) for 6 hours 7 days after plating (Fig. 1A). In control neurons, the concentration of KCl was 5mM. As previously reported, in physiological conditions, a tau-positive band at 52 kDa was detected in the medium by the anti-tau antibody A0024 recognizing total tau [10]. When neurons were treated with either 10mM or 20mM KCl, this band was significantly increased compared to control neurons (Fig. 1A and B). To eliminate the possibility that the increase of tau in the medium was caused by cell damage induced by hyperexcitability, the amount of lactate dehydrogenase (LDH), a marker of cell membrane integrity, was measured in the culture medium [45]. No significant difference was noted between control and neurons incubated with elevated concentrations of KCl indicating that the increase of tau in the medium did not result from cell damage (Fig. 1C). We examined the phosphorylation of tau in the cell lysate to determine whether it was affected by hyperexcitability. In the cell lysate, two main bands at 52 and 57 kDa were detected by the antibody A0024 in control and treated neurons (Fig. 1A). Tau phosphorylation was significantly decreased at serine (S)199/S202 but not at threonine (T) 181 and S404 (Fig. 1D). The staining of the Tau-1 antibody recognizing unphosphorylated tau was not changed when neurons were treated with high concentration of KCl (Fig. 1D). Collectively, the above observations revealed that tau secretion was significantly increased by hyperexcitability.

The increase of tau secretion upon neuronal hyperexcitability is caused by the Golgi fragmentation induced upon cdk5 activation

We and others reported that tau secretion mainly involves unconventional secretory pathways [9,12,16,28-30]. Hyperexcitability was reported to induce a fragmentation of the Golgi [46]. The fragmentation of the Golgi was shown to either decrease or increase secretion of proteins depending on the factor inducing it [43,47]. Based on this, we investigated whether the fragmentation of the Golgi was involved in the increased tau secretion induced by hyperexcitability. Firstly, we confirmed that the Golgi was fragmented upon hyperexcitability as previously reported. Neurons incubated with elevated concentrations of KCl were fixed and processed for immunofluorescence using an antibody directed against GM130, a marker of the cis-Golgi [48]. In control neurons, the Golgi appeared as a compacted tubular structure near the nucleus whereas in treated neurons, the Golgi was fragmented in multiple disconnected dots dispersed in the cell body (Fig. 2A). Consistent with this reorganization, the Golgi area was significantly increased when neurons were either treated with 10mM or 20 mM KCl for 6 hours (Fig. 2B). Secondly, we examined the signaling pathway leading to the fragmentation of the Golgi. Cdk5 activation was shown to result in a fragmentation of the Golgi [49]. We therefore examined whether cdk5 was activated in our experimental conditions (Fig. 2C-F). Activation of cdk5 depends on the cleavage of p35 in p25 by calpain, a cysteine proteinase activated by an increase of cytosolic calcium as noted upon hyperexcitability [50,51]. To detect calpain activity, we analyzed whether spectrin, a calpain substrate, was cleaved upon neuronal hyperexcitability. Cleavage of spectrin by calpain results in the production of a fragment of 150kDa [52]. As revealed by western blot analysis using an anti-spectrin antibody, a band at 150kDa was noted in the cell lysate of neurons treated with either 10 mM or 20mM of KCl but its quantification by densitometry revealed that its increase was only significant with the 20mM KCl treatment (Fig.

2C and D). The presence of a spectrin-positive band at 150kDa confirmed the activation of calpain upon hyperexcitability. To confirm that cdk5 was activated, we examined whether p35 was cleaved in p25. Although a weak band was detected in the cell lysate of neurons treated with 10mM KCl, the band corresponding to p25 was only significantly increased in neurons treated with 20mM KCl (Fig. 2E and F). To confirm that the Golgi fragmentation upon hyperexcitability was induced by the activation of cdk5, neurons were pre-treated with the cdk5 inhibitor olomoucine. This inhibitor prevents cdk5 activation by acting as a competitive inhibitor for ATP [53]. Neurons were pre-incubated with 10 μ m of olomoucine 1 h before treatment with 20mM KCl. After a 6 h incubation with KCl, neurons were fixed to examine whether olomoucine could prevent the fragmentation of the Golgi induced by hyperexcitability. To make sure that the treatment with olomoucine did not affect the treatment with an elevated concentration of KCl, we examined whether spectrin and p35 were cleaved in neurons pre-treated with olomoucine (Fig. 3A). As expected, both spectrin and p35 were cleaved confirming that hyperexcitability was induced in neurons treated with both olomoucine and a high concentration of KCl. As shown in Figure 3B, neurons treated with both olomoucine and 20mM KCl presented a lower fragmentation of the Golgi than the neurons only treated with 20mM KCl as revealed by the GM130 staining. The Golgi area in neurons treated with both olomoucine and 20mM KCl was similar to that of control neurons (Fig. 3C).

To demonstrate that the fragmentation of the Golgi was directly involved in the increase of tau secretion induced by hyperexcitability, we examined whether tau secretion was affected by olomoucine (Fig. 3D and E). Upon hyperexcitability, tau secretion was decreased when neurons were pre-treated with olomoucine indicating that the fragmentation of the Golgi was necessary for

the increase of tau secretion by this insult. We also measured LDH in the medium to make sure that neurons were not damaged by the drug treatment (Fig. 3F).

Overexpression of Rab1A prevents Golgi fragmentation and reduces tau secretion in Hela cells

In a previous study, we noted a fragmentation of the Golgi in tau transgenic mice as well as upon the overexpression of human tau in primary hippocampal neurons [38]. Based on the above observations, one could speculate that the fragmentation of the Golgi induced by human tau overexpression could contribute to its release in the extracellular space whereas the prevention of this fragmentation would decrease it. To determine whether the fragmentation of the Golgi induced by tau overexpression increases its secretion, we employed Hela cells that can secrete human tau. Most importantly, secreted human tau by Hela cells is dephosphorylated as noted for tau secreted by neurons [9,10]. The overexpression of human tau in Hela cells induced a fragmentation of the Golgi as noted in neurons (Fig. 4A). Rab proteins, small GTPases involved in membrane trafficking, play pivotal roles in the maintenance of the Golgi morphology [54]. For example, the overexpression of Rab1A involved in the ER-to-Golgi trafficking, was shown to prevent the fragmentation of the Golgi whereas its depletion had the opposite effect [34,55]. This Rab was overexpressed in Hela cells to determine whether it could block the fragmentation of the Golgi upon tau overexpression. Hela cells were co-transfected with either GFP-Rab1A and human Flag-tau4R or empty vector and Flag-tau4R (Fig. 4A). After 48 h of transfection, cells were fixed to examine the Golgi fragmentation using an antibody directed against GM130. As expected, GFP-Rab1A was found enriched at the Golgi [56]. In tau- and GFP-positive cells, no fragmentation of the Golgi was noted indicating that the overexpression of Rab1A was efficient in blocking tau-induced Golgi fragmentation. The Golgi presented a compact morphology when

both Rab1A and tau were overexpressed as revealed by the morphological analysis of the Golgi (Fig. 4B). The overexpression of Rab1A in HeLa cells expressing tau was also confirmed by western blotting. Both endogenous and overexpressed Rab1A were detected by an anti-Rab1A antibody (Fig. 4C). Endogenous Rab1A was found at 22kDa whereas Rab1A fused to a GFP tag was found at 47kDa. We then examined whether tau secretion would be affected by blocking the fragmentation of the Golgi by the overexpression of Rab1A. The analysis of tau secretion revealed that it was significantly decreased when the Golgi fragmentation was prevented (Fig. 4D and E). The LDH was not significantly different between cells overexpressing either Flag-tau4R and the empty vector or Flag-tau4R and GFP-Rab1A (Fig. 4F). The converse experiment was performed to determine whether an increase of the fragmentation of the Golgi by suppression of Rab1A would increase tau secretion by HeLa cells. To explore this point, Rab1A was suppressed by using siRNAs before the Golgi fragmentation was induced by tau. The knockdown of Rab1A was confirmed by western blotting (Fig. 5A). Firstly, we determined whether depletion of Rab1A induced a fragmentation of the Golgi in HeLa cells. As expected, the Golgi was fragmented in cells treated with Rab1A siRNAs as revealed by both GM130 immunofluorescence and a morphological analysis of the Golgi area (Fig. 5B and C). Secondly, we examined whether the induction of the Golgi fragmentation by the suppression of Rab1A would increase tau secretion. To do this, HeLa cells were transfected with Rab1A siRNA 24 h before tau was overexpressed to make sure that the Golgi was fragmented when tau expression began. The induction of the Golgi fragmentation by suppression of Rab1A resulted in an increase of tau secretion (Figure 5D and E). Collectively, the above observations revealed that the fragmentation of the Golgi increased tau secretion and therefore in AD where such a fragmentation is noted, one can speculate that it could contribute to the increased release of tau by neurons, which would correlate with its accumulation in the CSF and the propagation of its pathology.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that the fragmentation of the Golgi enhanced tau secretion by both primary cortical neurons and HeLa cells overexpressing human tau. Interestingly, neuronal hyperexcitability increased tau secretion. This increase could be reduced by preventing the Golgi fragmentation through the inactivation of cdk5 in primary cortical neurons. In HeLa cells, the prevention of the fragmentation of the Golgi by the overexpression of Rab1A decreased tau secretion whereas the suppression of Rab1A inducing a fragmentation of the Golgi increased tau secretion. Collectively, the above data revealed that the Golgi apparatus regulates tau secretion.

The Golgi plays a pivotal role in post-translational protein modifications and secretory trafficking [57]. Several studies also revealed that the Golgi is a signaling hub involved in the response to environmental cues and stressors by modulating signaling cascades due to the important number of signaling proteins bound to it [58]. In neurons, the Golgi is mainly located in the cell body but small Golgi outposts were observed in the dendrites [59]. No Golgi structures are present in the axon except vesicles originating from the trans-Golgi network (TGN) [60]. The Golgi apparatus is composed of stacks of flattened discrete membrane-bound compartments called cisternae [31]. However, a fragmentation of the Golgi corresponding to a reorganization of the Golgi into multiple disconnected structures was observed in both physiological and pathological conditions. For example, a fragmentation of the Golgi was reported during cell migration and division as well as in neurodegenerative diseases such as AD and amyotrophic lateral sclerosis [32-34,61]. The fact that a Golgi fragmentation is noted in physiological conditions indicates that it could be a compensatory reaction to allow rapid transport of proteins to their final destination when a cell undergoes a major reorganization to adapt to novel needs. Consistent with this, the Golgi fragmentation was shown to increase vesicle budding from the

Golgi membranes and accelerates protein trafficking in certain conditions [62]. However, studies have reported that the fragmentation of the Golgi could be detrimental to a cell by preventing the anterograde transport of large cargos [63]. Golgi fragmentation was also shown to affect protein and lipid glycosylation altering their function at the cell surface [64]. Based on the above observations, the fragmentation of the Golgi could be either beneficial or detrimental depending on the cell types and the factors inducing it. In AD, a fragmentation of the Golgi was reported to perturb the processing of amyloid precursor protein (APP) resulting in an increased production of A β , which in turn further fragments the Golgi [43]. Most importantly, the A β -induced fragmentation was shown to increase the trafficking from the Golgi to the plasma membrane [43]. However, it remains to be demonstrated whether this increase is detrimental to neurons.

In AD, a fragmentation of the Golgi was reported more than a decade ago but the mechanisms involved in such an event remain largely unexplored. The Golgi morphology is regulated by 3 classes of proteins: the microtubules and microtubule-associated motor proteins; the structural Golgi proteins; and the proteins of the Golgi transport machinery [34]. A β was shown to induce the fragmentation of the Golgi by the activation of cdk5 that phosphorylates GRASP65, a protein involved in the formation of tubular connections between the Golgi stacks [43]. Here we showed that upon prolonged hyperexcitability, the activation of cdk5 contributes to the fragmentation of the Golgi as noted for A β -induced fragmentation indicating that that cdk5 could be a common target for the induction of this event in AD. In a previous study, we reported that tau could induce a fragmentation of the Golgi [38]. However, the mechanisms leading to this alteration of the Golgi remain to be elucidated. Since microtubules and motor proteins play important roles in the maintenance of the Golgi structure and knowing that tau affects the stability of microtubules and the binding of motor proteins to microtubules, one can speculate

that tau dysfunction can indirectly alter the Golgi structure through its effects on the microtubule network [65,66]. However, a direct role of tau in the Golgi fragmentation cannot be excluded, since we reported that tau was found at the surface of the Golgi where it could play a direct role in maintaining its morphology by participating in its association with microtubules [67]. This remains to be demonstrated. Collectively, the above observations indicate that several pathways could lead to a fragmentation of the Golgi in AD, making this organelle a convergent site for the induction of neuronal dysfunction and ultimately neurodegeneration.

It remains unclear how the secretion of tau is increased by the fragmentation of the Golgi. Upon this fragmentation, tau could be secreted through vesicles forming at the Golgi that would fuse with the plasma membrane to release their content. Our results support this. In HeLa cells, tau secretion was increased when Rab1A was suppressed, a condition inducing an increase trafficking from the Golgi to the plasma membrane [56]. Based on this observation and the fact that tau was found at the surface of the Golgi membranes, it can be speculated that tau-containing vesicles originating at the Golgi could travel along the axon to deliver tau at the presynaptic terminal [67]. These vesicles could fuse directly or indirectly through endosomes with the plasma membrane to release tau in the extracellular space [7]. If vesicles originating at the Golgi are involved in tau secretion, tau, being a cytosolic protein, is most likely attached at the surface of these vesicles, which implies that upon the fusion of these vesicles with the plasma membrane, tau would be found on the cytoplasmic side of the plasma membrane. However, an unknown flip-flop event taking place at the plasma membrane could result in the cytoplasmic side of the plasma membrane containing tau ending up on the extracellular side and thereby making possible the release of tau outside the cell as reported for annexin A2, known to interact with tau [68]. Another possibility would be that tau could reach the lumen of vesicles by an unknown

mechanism. In such a case, when the vesicles would fuse with the plasma membrane, tau would be released in the extracellular space.

Based on the present data revealing that the fragmentation of the Golgi increases tau secretion, the following cascade of events could result in the propagation of tau pathology in AD brain by the increase of tau secretion (Fig. 6). Hyperexcitability observed at early stages of the disease would fragment the Golgi resulting in an increased production of A β , which would induce tau pathology. Then, both the increase production of A β and tau pathology would further fragment the Golgi leading to an increase of tau secretion. Finally, since intracellular tau was shown to contribute to neuronal hyperexcitability and extracellular tau to increase A β production, this cascade would be further activated by the intracellular and extracellular accumulation of tau during the progression of the disease [20,69]. If such a cascade takes place in AD, the prevention of the Golgi fragmentation could be a suitable therapeutic target to slow the progression of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. The use of animals and all surgical procedures described in this article were carried out according to *The guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care*. Primary cortical cultures were prepared from E18 Sprague Dawley rat embryos. The cerebral cortices were treated with trypsin (0.025% at 37°C for 20 min). The

reaction was stopped with trypsin inhibitor solution containing DNase. Neurons were dissociated by several passages through a Pasteur pipette. The cells were then plated either on glass coverslips or on culture dishes coated with poly-D-lysine (Sigma, Oakville, ON, Canada). The neurons were maintained in neurobasal medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with glutamax (Invitrogen) and B27 (Invitrogen). Hela cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in EMEM supplemented with L-glutamine (ATCC, Manassas, VA, USA) and with 10% foetal bovine serum (Hyclone) (Thermo scientific) at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Treatment with KCl and olomoucine. Seven days after plating, neurons were incubated in neurobasal medium containing either 10mM or 20mM of KCl for 6 h to induce hyperexcitability. Control neurons were incubated in neuronal medium containing 5mM of KCl for 6 h. Then, the medium was collected and the cells lysed. To block the fragmentation of the Golgi induced by elevated concentrations of KCl, neurons were pre-incubated with 10µM of olomoucine (Cayman) for 1 h.

Transfection of Hela cells. Twenty-four h after plating, Hela cells were transfected with 100nM of Rab1A siRNA or 100nM of control siRNA using DermaFECT transfection reagent

(Thermo Scientific Dharmacon). Twenty-four h later, the cells were transfected with wild-type tau4R (Flag-Tau4R) using Genejuice transfection reagent (Millipore). Forty-eight h after tau transfection, the culture medium was collected and the cells were either lysed or fixed. A human ON-TARGETplus SMARTpool siRNA was used to knockdown Rab1A in HeLa cells (L-008283-00, Thermo Scientific Dharmacon). Rab1A siRNA pool: (5' CAGCAUGAAUCCCGAAUAU; 5' GUAGAACAGUCUUUCAUGA; 5' GGAAACCAGUGCUAAGAAU; 5' UGAGAAGUCCAAUGUUAAA) targeted Rab1A mRNA at positions 392–410, 867–885, 839–857, 941–959, respectively. A non-targeting siRNA pool (D-001810-10-20, Thermo Scientific Dharmacon) was used as control. For the overexpression of Rab1A, 24 h after plating, Flag-Tau4R (0.75 µg) was co-transfected with either the empty vector (0.75 µg) or GFP-Rab1A (0.75 µg) using Genejuice. The plasmid GFP-Rab1A was obtained from Addgene. It was a gift from Dr. Marci Scidmore (Addgene plasmid #49467) [70]. Forty-eight h after transfection, the cells and medium were collected. The medium was centrifuged at 3000 RPM for 10 min at room temperature (RT) to remove cell debris, resuspended in Laemmli buffer 1x and boiled for 5 min.

Preparation of cell lysates. After the culture medium was collected, the cells were immediately washed twice with PBS and once with PBS containing 0.5M NaCl to detach proteins non-specifically attached to the cell surface. The neurons were then lysed in modified RIPA buffer [Tris HCl pH 7.5 50mM, NaCl 150mM, Triton X-100 0.5%, sodium deoxycholate (SDC) 0.5%, sodium dodecyl sulfate (SDS) 1%, dithiothreitol (DTT) 1mM, NaF 50mM, Na₃VO₄ 5mM] containing a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free from Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and phosphatase inhibitor cocktail 2× (PhosSTOP from Roche Diagnostics).

The HeLa cells were lysed in buffer containing NaCl 150mM, Tris HCl pH7.5 50mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, SDC 1%, and a protease inhibitor cocktail. Proteins were quantified using Bio-Rad DC Protein assay (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada). The lysates were mixed with laemmli buffer 1x and boiled for 5 min.

Immunoprecipitation of tau from neuronal medium. After treatment, the culture medium of control and treated neurons was collected and centrifuged at 3000 RPM for 10 min at RT to remove cell debris. To analyze the amount of secreted tau, tau was immunoprecipitated from the culture medium. For each condition, 60 µl of magnetic beads coupled with anti-mouse antibodies (Invitrogen, Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG) were washed in PBS containing 0.1% BSA and incubated overnight (O/N) at 4°C with 0.4µg of the anti-tau antibody Tau-5 (Invitrogen, a.a. 210-241). The beads were then washed and incubated for 2 h at 4°C with 1.5 ml of the culture medium. The complex bead-antibody-antigen was then washed in PBS, resuspended in 20µl of Laemmli buffer and boiled for 5 min.

Analysis of cell membrane integrity. Cell membrane integrity was assessed by the measurement of the LDH activity in the culture medium using the LDH cytotoxicity assay kit from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA), according to the manufacturer's instructions. The LDH content in the samples was measured with a BIO-TEK Elx800 plate reader.

Immunoblotting. Equal amounts of proteins were loaded in each lane and electrophoresed on a 10% polyacrylamide gel. Following SDS-PAGE separation, proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. Then the membranes were

incubated in 5% milk diluted in 0.2% Tween-20 Tris buffered saline (TBST) for 1 h. The nitrocellulose stripes were incubated with the primary antibodies O/N at 4°C. The antibodies used were: A0024 total tau (1/15000) (DAKO, a.a. 243-441), Tau1 (1/1000) (Millipore, dephosphorylated a.a. 195, 198, 199 and 202), Phospho-T181 (1/1000) (Invitrogen, epitope pT181), Phospho-S404 (1/1000) (Biosource, epitope pS404), Phospho-S199/202 (1/1000) (Thermo Scientific, epitopes pS199 and pS202), Rab1A(1/100) (Santa Cruz, epitope mapping within the C-terminus), Spectrin (1/100) (Millipore, epitope n/a), p35 C-19 (1/100) (Santa Cruz, epitope mapping at the C-terminus). They were then washed in TBST and incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibodies. Membranes were again washed and revealed by chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Quebec, Quebec, Canada). The image acquisition and densitometry were performed with a ChemiDoc™ MP System. After incubation with tau antibodies, membranes were revealed using an anti- γ -actin antibody (1-24) (1/5000) (Santa-Cruz Biotechnology Inc, Santa-Cruz, CA) to monitor protein loading.

Immunofluorescence and quantification of the Golgi area. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde prepared in PBS for 30 min. Cells were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min. Cultures were kept in PBS until they were processed for immunofluorescence. For immunofluorescence, coverslips were blocked with 5% normal goat serum (NGS) (Invitrogen) in PBS. Then coverslips were stained with the antibody A0024 directed against total tau (1/500) (DAKO) and an antibody against the Golgi marker, GM130 (1/50) (BD Biosciences, a.a. 869-982). After 3 washes in PBS, coverslips were incubated with either an anti-rabbit antibody coupled to FITC (1/500, Jackson ImmunoResearch), with an anti-rabbit antibody coupled to Alexa 350 (1/500, Invitrogen) or anti-mouse antibody coupled to Rhodamine (1/500, Jackson ImmunoResearch). The antibody were diluted in the blocking

solution. Incubations were carried out at RT for 1 h. Coverslips were then washed in PBS and mounted in mowiol. Labeled cells were visualized with an axioplan Zeiss fluorescence microscope using $\times 63$ objective.

The surface of the Golgi was analyzed using the ImageJ software. After calibration, the tool freehand was used to delimitate the surface of the cell body containing Golgi-positive structures detected with an antibody directed against GM130. The surface was automatically calculated by the software based on the calibration. The Golgi area was analyzed in at least 30 cells for each set of experiments and each condition. The mean of the Golgi surface area was used for comparison among the different conditions.

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated with a two-tailed unpaired t-test when two conditions are compared. A one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by a Tukey's multiple comparison test was performed for more than two groups comparison. The statistical analysis was performed using Prism 6.0c software.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research [MOP-114874 to N.L.], and an FRQS infrastructure grant to the Groupe de Recherche sur le système nerveux central (GRSNC) to N.L.. N.-V. M. has a studentship from the GRSNC. We would like to thank Dr. Marci Scidmore for the GFP-Rab1A plasmid obtained from Addgene. Lastly, we would like to thank all the lab members for helpful discussions.

Author contribution: N.-V. M. performed the experiments and analysis of the data. N.-V. M. and N.L. designed the experiments and wrote the paper.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

BIBLIOGRAPHY

1. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung Y, Zaidi M, Wisniewski H (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **261**: 6084 - 6089
2. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y, Quinlan M, Wisniewski H, Binder L (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 4913 - 4917
3. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239-259
4. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L (2011) The many faces of tau. *Neuron* **70**: 410-426
5. Clavaguera F, Hench J, Goedert M, Tolnay M (2015) Invited review: Prion-like transmission and spreading of tau pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* **41**: 47-58
6. Walker LC, Diamond MI, Duff KE, Hyman BT (2012) Mechanisms of Protein Seeding in Neurodegenerative Diseases. *Arch Neurol*, 1476565 [pii]
10.1001/jamaneurol.2013.14531-7
7. Mohamed NV, Herrou T, Plouffe V, Piperno N, Leclerc N (2013) Spreading of tau pathology in Alzheimer's disease by cell-to-cell transmission. *Eur J Neurosci* **37**: 1939-1948
8. Kim W, Lee S, Hall GF (2010) Secretion of human tau fragments resembling CSF-tau in Alzheimer's disease is modulated by the presence of the exon 2 insert. *FEBS Lett* **584**: 3085-3088
9. Plouffe V, Mohamed NV, Rivest-McGraw J, Bertrand J, Lauzon M, Leclerc N (2012) Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PLoS One* **7**: e36873
10. Mohamed NV, Plouffe V, Remillard-Labrosse G, Planel E, Leclerc N (2014) Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons. *Sci Rep* **4**: 5715
11. Yamada K, Cirrito JR, Stewart FR, Jiang H, Finn MB, Holmes BB, Binder LI, Mandelkow EM, Diamond MI, Lee VM, *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**: 13110-13117
12. Chai X, Dage JL, Citron M (2012) Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol Dis* **48**: 356-366

13. Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, Steinberg JI, Margittai M, Kaye R, Zurzolo C, *et al.* (2012) Small misfolded tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem* **288**: 1856-1870
14. Karch CM, Jeng AT, Goate AM (2012) Extracellular tau levels are influenced by variability in tau that is associated with tauopathies. *J Biol Chem* **287**: 42751-42762
15. Kfoury N, Holmes BB, Jiang H, Holtzman DM, Diamond MI (2012) Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J Biol Chem* **287**: 19440-19451
16. Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Jackson B, McKee AC, Alvarez VE, Lee NC, Hall GF (2012) Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* **287**: 3842-384
17. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, *et al.* (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* **11**: 909-913
18. Frost B, Jacks RL, Diamond MI (2009) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* **284**: 12845-12852
19. Kanmert D, Cantlon A, Muratore CR, Jin M, O'Malley TT, Lee G, Young-Pearse TL, Selkoe DJ, Walsh DM (2015) C-Terminally Truncated Forms of Tau, But Not Full-Length Tau or Its C-Terminal Fragments, Are Released from Neurons Independently of Cell Death. *J Neurosci* **35**: 10851-10865
20. Bright J, Hussain S, Dang V, Wright S, Cooper B, Byun T, Ramos C, Singh A, Parry G, Stagliano N, *et al.* (2015) Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiol Aging* **36**: 693-709
21. Takeda S, Wegmann S, Cho H, DeVos SL, Commins C, Roe AD, Nicholls SB, Carlson GA, Pitstick R, Nobuhara CK, *et al.* (2015) Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nat Commun* **6**: 8490
22. de Calignon A, Polydoro M, Suarez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, *et al.* (2012) Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron* **73**: 685-697

23. Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, Duff K (2012) Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One* **7**: e31302
24. Calafate S, Buist A, Miskiewicz K, Vijayan V, Daneels G, de Strooper B, de Wit J, Verstreken P, Moechars D (2015) Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation. *Cell Rep* **11**: 1176-1183
25. Barten DM, Cadelina GW, Hoque N, DeCarr LB, Guss VL, Yang L, Sankaranarayanan S, Wes PD, Flynn ME, Meredith JE, *et al.* (2011) Tau transgenic mice as models for cerebrospinal fluid tau biomarkers. *J Alzheimers Dis* **24 Suppl 2**: 127-141
26. Yamada K, Holth JK, Liao F, Stewart FR, Mahan TE, Jiang H, Cirrito JR, Patel TK, Hochgrafe K, Mandelkow EM, *et al.* (2014) Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *J Exp Med* **211**: 387-393
27. Pooler AM, Phillips EC, Lau DH, Noble W, Hanger DP (2013) Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO reports* **14**: 389-394
28. Simon D, Garcia-Garcia E, Gomez-Ramos A, Falcon-Perez JM, Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Avila J (2012) Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener Dis* **10**: 73-75
29. Simon D, Garcia-Garcia E, Royo F, Falcon-Perez JM, Avila J (2012) Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett* **586**: 47-54
30. Dujardin S, Begard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, Loyens A, Galas MC, Bousset L, Melki R, *et al.* (2014) Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS One* **9**: e100760
31. Ladinsky MS, Mastronarde DN, McIntosh JR, Howell KE, Staehelin LA (1999) Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol* **144**: 1135-1149
32. Fan J, Hu Z, Zeng L, Lu W, Tang X, Zhang J, Li T (2008) Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *Int J Dev Neurosci* **26**: 523-
33. Shorter J, Warren G (2002) Golgi architecture and inheritance. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 379-420
34. Haase G, Rabouille C (2015) Golgi Fragmentation in ALS Motor Neurons. New Mechanisms Targeting Microtubules, Tethers, and Transport Vesicles. *Front Neurosci* **9**: 448
35. Stieber A, Mourelatos Z, Gonatas NK (1996) In Alzheimer's disease the Golgi apparatus of

- a population of neurons without neurofibrillary tangles is fragmented and atrophic. *Am J Pathol* **148**: 415-426
36. Huse JT, Liu K, Pijak DS, Carlin D, Lee VM, Doms RW (2002) Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* **277**: 16278-16284
37. Dal Canto MC (1996) The Golgi apparatus and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **148**: 355-360
38. Liazoghli D, Perreault S, Micheva K, Desjardins M, Leclerc N (2005) Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons. *Am. J. Pathol.* **166**: 1499-1514
39. Palop JJ, Mucke L (2009) Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol* **66**: 435-440
40. Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, Haass C, Staufenbiel M, Konnerth A, Garaschuk O (2008) Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y)* **321**: 1686-1689
41. Busche MA, Chen X, Henning HA, Reichwald J, Staufenbiel M, Sakmann B, Konnerth A (2012) Critical role of soluble amyloid-beta for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 8740-8745
42. Bakker A, Krauss GL, Albert MS, Speck CL, Jones LR, Stark CE, Yassa MA, Bassett SS, Shelton AL, Gallagher M (2012) Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron* **74**: 467-474
43. Joshi G, Chi Y, Huang Z, Wang Y (2014) Abeta-induced Golgi fragmentation in Alzheimer's disease enhances Abeta production. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: E1230-1239
44. Pooler AM, Polydoro M, Maury EA, Nicholls SB, Reddy SM, Wegmann S, William C, Saqran L, Cagsal-Getkin O, Pitstick R, *et al.* (2015) Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* **3**: 14
45. Flach K, Hilbrich I, Schiffmann A, Gartner U, Kruger M, Leonhardt M, Waschipky H, Wick L, Arendt T, Holzer M (2012) Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. *J Biol Chem* **287**: 43223-43233
46. Thayer DA, Jan YN, Jan LY (2013) Increased neuronal activity fragments the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 1482-1487

47. Farber-Katz SE, Dippold HC, Buschman MD, Peterman MC, Xing M, Noakes CJ, Tat J, Ng MM, Rahajeng J, Cowan DM, *et al.* (2014) DNA damage triggers Golgi dispersal via DNA-PK and GOLPH3. *Cell* **156**: 413-427
48. Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE, Warren G (1995) Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* **131**: 1715-1726
49. Sun KH, de Pablo Y, Vincent F, Johnson EO, Chavers AK, Shah K (2008) Novel genetic tools reveal Cdk5's major role in Golgi fragmentation in Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* **19**: 3052-3069
50. Khorchid A, Ikura M (2002) How calpain is activated by calcium. *Nat Struct Biol* **9**: 239-241
51. Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**: 360-364
52. Veeranna, Kaji T, Boland B, Odrliin T, Mohan P, Basavarajappa BS, Peterhoff C, Cataldo A, Rudnicki A, Amin N, *et al.* (2004) Calpain mediates calcium-induced activation of the erk1,2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **165**: 795-805
53. Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, Leclerc S, *et al.* (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* **224**: 771-786
54. Liu S, Storrie B (2015) How Rab proteins determine Golgi structure. *Int Rev Cell Mol Biol* **315**: 1-22
55. Coune PG, Bensadoun JC, Aebischer P, Schneider BL (2011) Rab1A over-expression prevents Golgi apparatus fragmentation and partially corrects motor deficits in an alpha-synuclein based rat model of Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* **1**: 373-387
56. Haas AK, Yoshimura S, Stephens DJ, Preisinger C, Fuchs E, Barr FA (2007) Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *J Cell Sci* **120**: 2997-3010
57. Glick BS, Luini A (2011) Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a005215
58. Luini A, Parashuraman S (2016) Signaling at the Golgi: sensing and controlling the membrane fluxes. *Curr Opin Cell Biol* **39**: 37-42

59. Horton A, Râcz B, Monson E, Ehlers M (2005) Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron* **48**: 757-771
60. Nakata T, Hirokawa N (2003) Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J Cell Biol* **162**: 1045-1055
61. Hurtado L, Caballero C, Gavilan MP, Cardenas J, Bornens M, Rios RM (2011) Disconnecting the Golgi ribbon from the centrosome prevents directional cell migration and ciliogenesis. *J Cell Biol* **193**: 917-933
62. Wang Y, Wei JH, Bisel B, Tang D, Seemann J (2008) Golgi cisternal unstacking stimulates COPI vesicle budding and protein transport. *PLoS One* **3**: e1647
63. Lavieu G, Dunlop MH, Lerich A, Zheng H, Bottanelli F, Rothman JE (2014) The Golgi ribbon structure facilitates anterograde transport of large cargoes. *Mol Biol Cell* **25**: 3028-3036
64. Zhang X, Wang Y (2016) Glycosylation Quality Control by the Golgi Structure. *J Mol Biol*, 10.1016/j.jmb.2016.02.030
65. Kadavath H, Hofele RV, Biernat J, Kumar S, Tepper K, Urlaub H, Mandelkow E, Zweckstetter M (2015) Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 7501-7506
66. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF (2008) Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science (New York, N.Y)* **319**: 1076-1079
67. Farah C, Perreault S, Liazoghli D, Desjardins M, Anton A, Lauzon M, Paiement J, Leclerc N (2006) Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* **63**: 710-724
68. Danielsen EM, van Deurs B, Hansen GH (2003) "Nonclassical" secretion of annexin A2 to the luminal side of the enterocyte brush border membrane. *Biochemistry* **42**: 14670-14676
69. Hall AM, Throesch BT, Buckingham SC, Markwardt SJ, Peng Y, Wang Q, Hoffman DA, Roberson ED (2015) Tau-dependent Kv4.2 depletion and dendritic hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **35**: 6221-6230
70. Rzomp KA, Scholtes LD, Briggs BJ, Whittaker GR, Scidmore MA (2003) Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect Immun* **71**: 5855-5870

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Neuronal hyperexcitability increases tau secretion. (A) Western blot analysis of tau secretion by rat neurons cultured with either a physiological concentration of KCl (5mM, CTL) or an elevated concentration of KCl (10mM or 20mM). Tau secretion was increased by elevated concentrations of KCl. The medium (M) and cell lysate (L) were revealed with the anti-tau antibody A0024. (B) Quantification of the ratio of total tau in the medium/total tau in the cell lysate by densitometry (arbitrary unit). The amount of total tau in the cell lysate was normalized to that of actin used as loading control. Statistical significance was assessed by comparison of all conditions between them ($n = 7$, mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's test, $*P < 0.05$). (C) Cell damage was evaluated by measuring the amount of LDH released in the culture medium. The increase of LDH in the medium was not statistically different (n.s) between control and treated neurons ($n = 7$, mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's test). (D) Western Blot analysis of tau phosphorylation in neurons treated with 10mM KCl. The phosphorylation of T181 and S404 was not affected by the KCl treatment whereas the phosphorylation of S199/S202 was decreased. The signal of the phospho-antibodies was normalized with that of total tau, which was normalized to that of actin. ($n = 5$, mean \pm SEM, unpaired t-test two-tailed, $*P < 0.05$). The amount of dephosphorylated tau revealed by the antibody Tau-1 was normalized to that of total tau lysate, which was normalized to the levels of actin ($n = 5$, mean \pm SEM, unpaired t-test two-tailed, $*P < 0.05$).

Fig 2. Golgi fragmentation induced by cdk5 activation is responsible for the increase of tau secretion upon neuronal hyperexcitability. (A) Immunostaining with the antibody directed against the Golgi marker, GM130 (red) and the antibody A0024 directed against total tau (green).

The golgi apparatus was fragmented when neurons are incubated with elevated concentrations of KCl concentrations (arrows). Scale bar = 30 μ m. (B) Quantitative analysis of the surface area of the Golgi complex (μ m²) upon either physiological or high concentrations of KCl revealed that hyperexcitability increases Golgi fragmentation. At least 30 cells were evaluated for each condition and in each set of experiments (n = 6, mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's test, *P < 0.05). (C) Western blot analysis of calpain activity in neuronal cell lysates upon either physiological (CTL) or elevated concentrations of KCl (10mM or 20mM). The cleavage of spectrin (240 kDa) by calpain results in the generation of a 150 kD fragment (SBP). (D) The ratio of SBP/full-length spectrin was quantified by densitometry (arbitrary unit). All the conditions were compared between them (n = 6, mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's test, *P < 0.05). (E) Western blot analysis of cdk5 activity in cell lysate upon either physiological (CTL) or elevated concentrations of KCl (10mM or 20mM) by examined the cleavage of p35 to p25. (F) The quantification of the ratio p25/p35 by densitometry (arbitrary unit) revealed that p25 was increased upon hyperexcitability (n = 6, mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's test, *P < 0.05).

Fig 3. Cdk5 inhibition prevents the fragmentation of the Golgi and decreases tau secretion.

Neurons were pre-incubated for 1h with 10 μ M olomoucine before being treated with 20mM KCl for 6 h. (A) The western blot analysis of spectrin and p35 cleavage showed that hyperexcitability induction was not affected by the pre-incubation with olomoucine. (B) Immunostaining with the antibody directed against the Golgi marker, GM130 (red) and the antibody A0024 directed against total tau (green). The Golgi was fragmented when neurons were treated with an elevated concentration of KCl (arrow). The Golgi was not fragmented when neurons were pre-incubated with olomoucine and then treated with an elevated concentration of KCl. Scale bar = 30 μ m. (C)

Quantitative analysis of the surface area of the Golgi complex (μm^2) upon either physiological, a high concentration of KCl or a high concentration of KCl + olomoucine. The olomoucine pre-treatment prevented Golgi fragmentation induced by the KCl treatment ($n = 5$, mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). (D) Western blot analysis of tau secretion. The medium (M) and cell lysate (L) were revealed using the antibody A0024. The increase of tau secretion induced by a high concentration of KCl was prevented when neurons were pre-treated with olomoucine. (E) Quantification of the ratio of total tau in the medium/total tau in the cell lysate by densitometry (arbitrary unit). The amount of total tau in the cell lysate was normalized to that of actin used as loading control. Statistical significance was assessed by comparison of all conditions between them ($n = 10$, mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). (F) Cell damage was evaluated by measuring the amount of LDH released in the culture medium. The increase of LDH in the medium was not statistically different (n.s) between all the conditions ($n = 10$, mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's test).

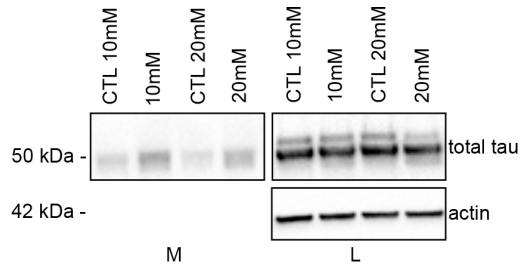
Fig 4. Overexpression of Rab1A prevents Golgi fragmentation and reduces tau secretion by HeLa cells. (A) Immunostaining with the antibody directed against the Golgi marker, GM130 (red) and the antibody A0024 directed against total tau (blue). Rab1A was fused to a GFP tag (green). The Golgi was compact when Rab1A was overexpressed. Scale bar = $20\mu\text{m}$. (B) Quantitative analysis of the surface area of the Golgi complex (μm^2) in cells overexpressing Rab1A. ($n = 7$, mean \pm SEM, unpaired t-test two tailed, *** $P < 0.001$). (C) Western blot analysis to confirm the overexpression of Rab1A in HeLa cells. Endogenous level of Rab1A (22kDa) was similar in HeLa cells transfected with either Flag-Tau4R and an empty vector or FlagTau4R and GFP-Rab1A. The Rab1A fused to GFP (GFP-Rab1A) was found at 47 kDa. (D) Western blot analysis of tau secretion. The medium (M) and cell lysate (L) were revealed with the anti-tau

antibody A0024. Tau secretion was decreased upon Rab1A overexpression in HeLa cells. (E) Quantification of the ratio of total tau in the medium/total tau in the cell lysate by densitometry (arbitrary unit). The amount of total tau in the cell lysate was normalized to that of actin used as loading control. (n = 7, mean ± SEM, unpaired t-test two tailed, *P < 0.05) (F) Cell damage was evaluated by measuring the amount of LDH released in the culture medium. The amount of LDH in the medium was not affected by the overexpression of Rab1A (n.s). (n = 7, mean ± SEM, unpaired t-test two-tailed)

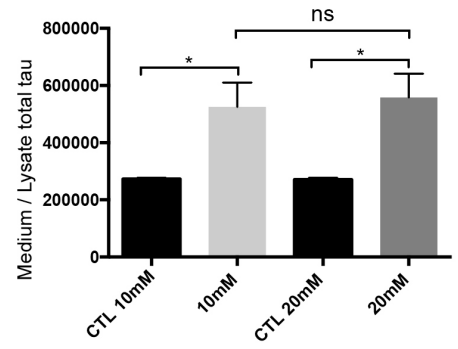
Fig 5. Suppression of Rab1A increases Golgi fragmentation and tau secretion. (A) The knockdown of Rab1A was confirmed by western blotting in HeLa cells transfected with wild-type tau (Flag-Tau4R) and Rab1A siRNA (siRab1A). (B) Immunostaining with the antibody directed against the Golgi marker, GM130 (red) and the antibody A0024 directed against total tau (green). The Golgi was fragmented when Rab1A was suppressed in HeLa cells either with or without Flag-Tau4R overexpression. Scale bar = 20µm. (C) Quantification of the surface area of the Golgi complex (µm²) when Rab1A was suppressed either with or without Flag-Tau4R overexpression. (n = 9, mean ± SEM, one-way ANOVA, Tukey's test, **P < 0.01). (D) Western blot analysis of tau secretion by HeLa cells transfected with either Flag-Tau4R and Rab1A siRNA or Flag-Tau4R and control siRNA (NegCTL). (E) The medium (M) and cell lysate (L) were revealed with the anti-tau antibody A0024. Tau secretion was increased upon Rab1A suppression in HeLa cells. (E) Quantification of the ratio of total tau in the medium/total tau in the cell lysate by densitometry (arbitrary unit). The amount of total tau in the cell lysate was normalized to that of actin used as loading control. (n = 5, mean ± SEM, paired t-test two-tailed, *P < 0.05).

Fig 6. Model illustrating the cascade of events leading to Golgi fragmentation and tau secretion. Hyperexcitability observed at early stages of AD would fragment the Golgi resulting in an increased production of A β , which would trigger tau pathology. Then, both the increase production of A β and tau pathology would further fragment the Golgi leading to an increase of tau secretion. Since intracellular tau was shown to contribute to neuronal hyperexcitability and extracellular tau to increase A β production, this cascade would be further activated by the intracellular and extracellular accumulation of tau during the progression of the disease resulting in a sustained elevated secretion of tau at later stages of the disease.

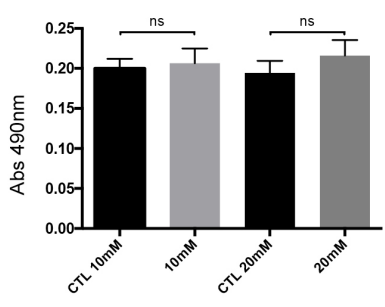
A



B



C



D

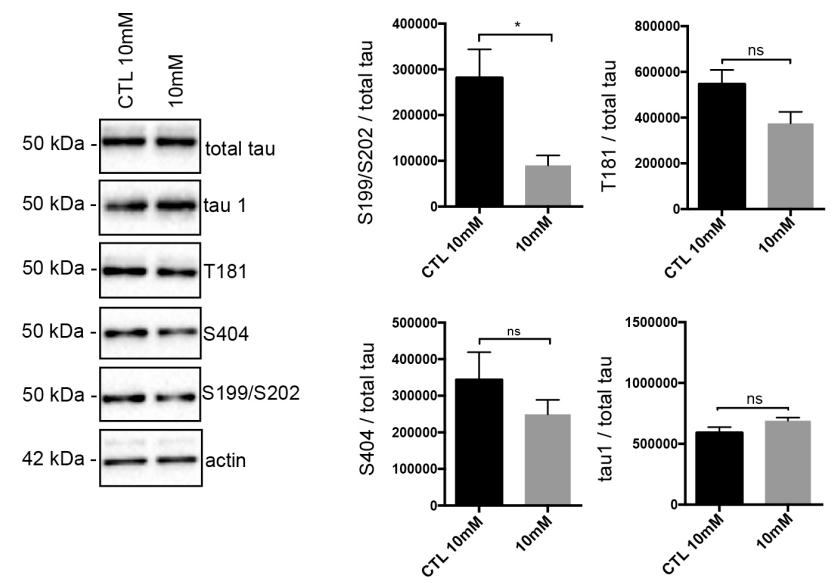


Fig 11

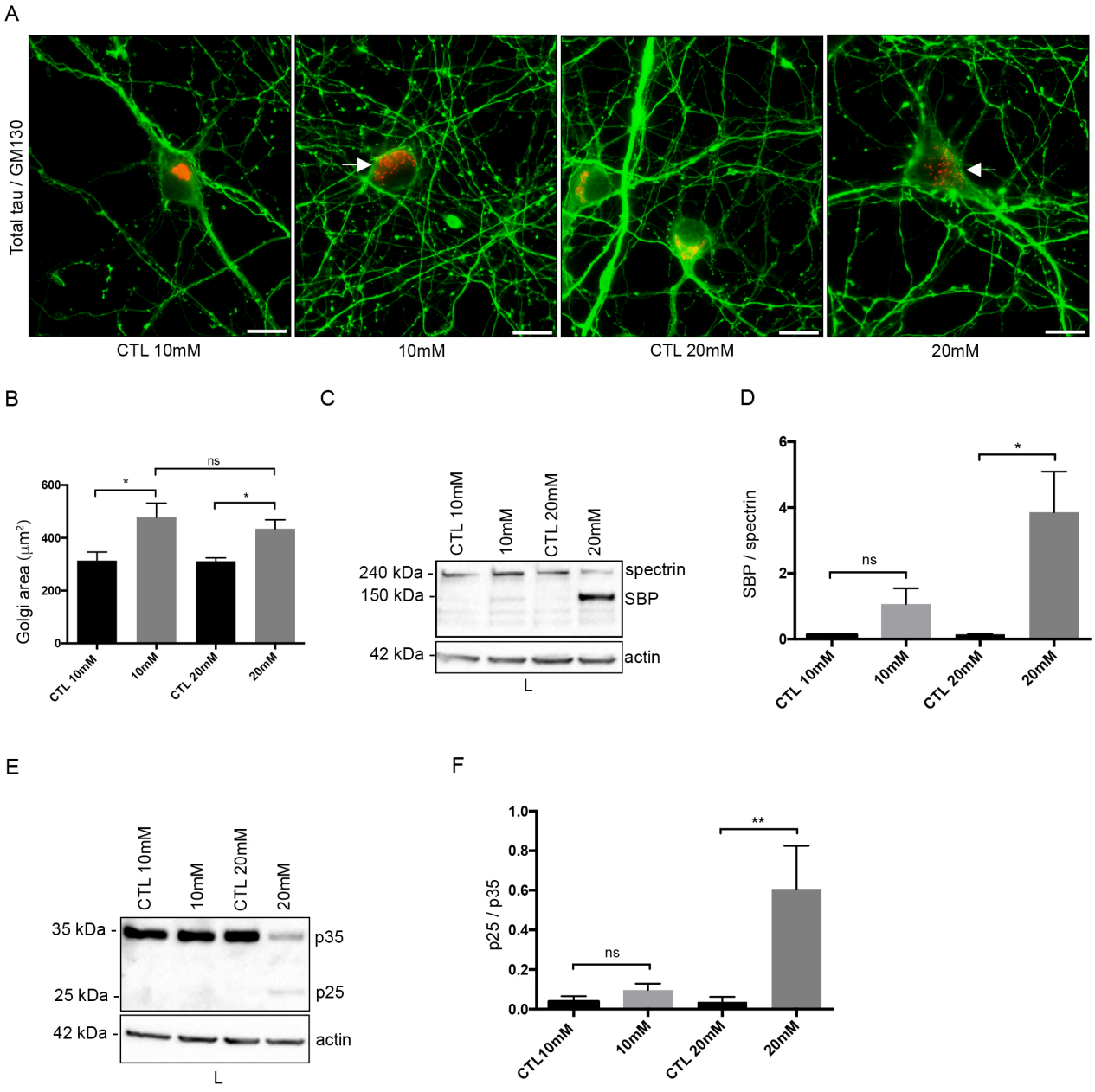
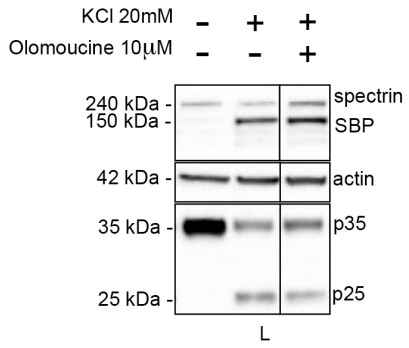
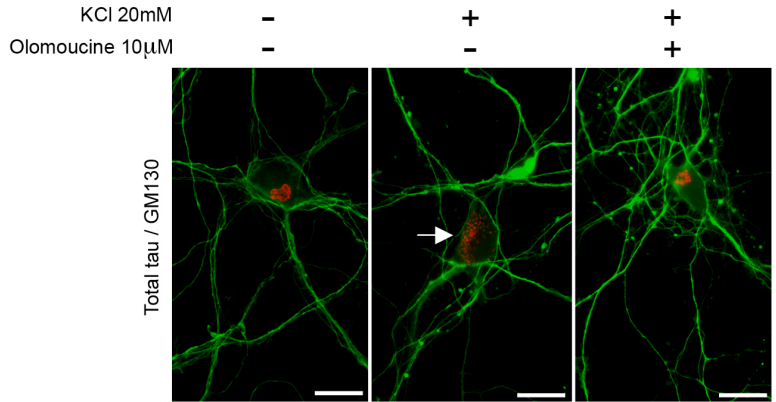


Fig 2 I

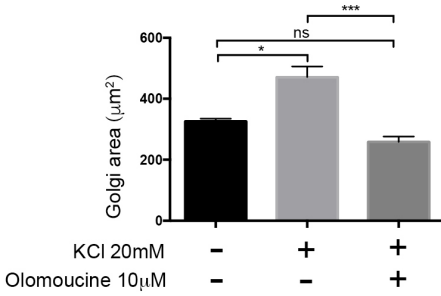
A



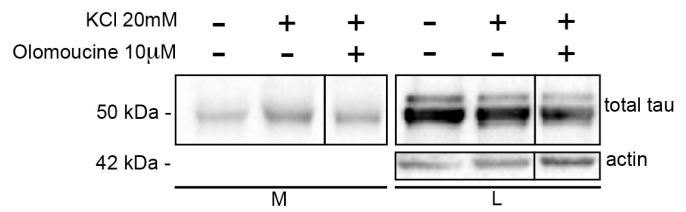
B



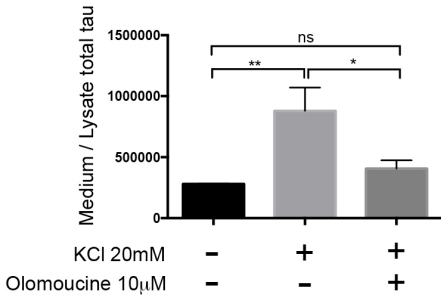
C



D



E



F

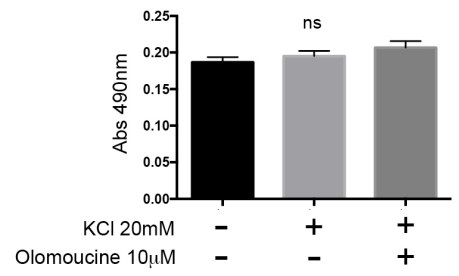


Fig 3 I

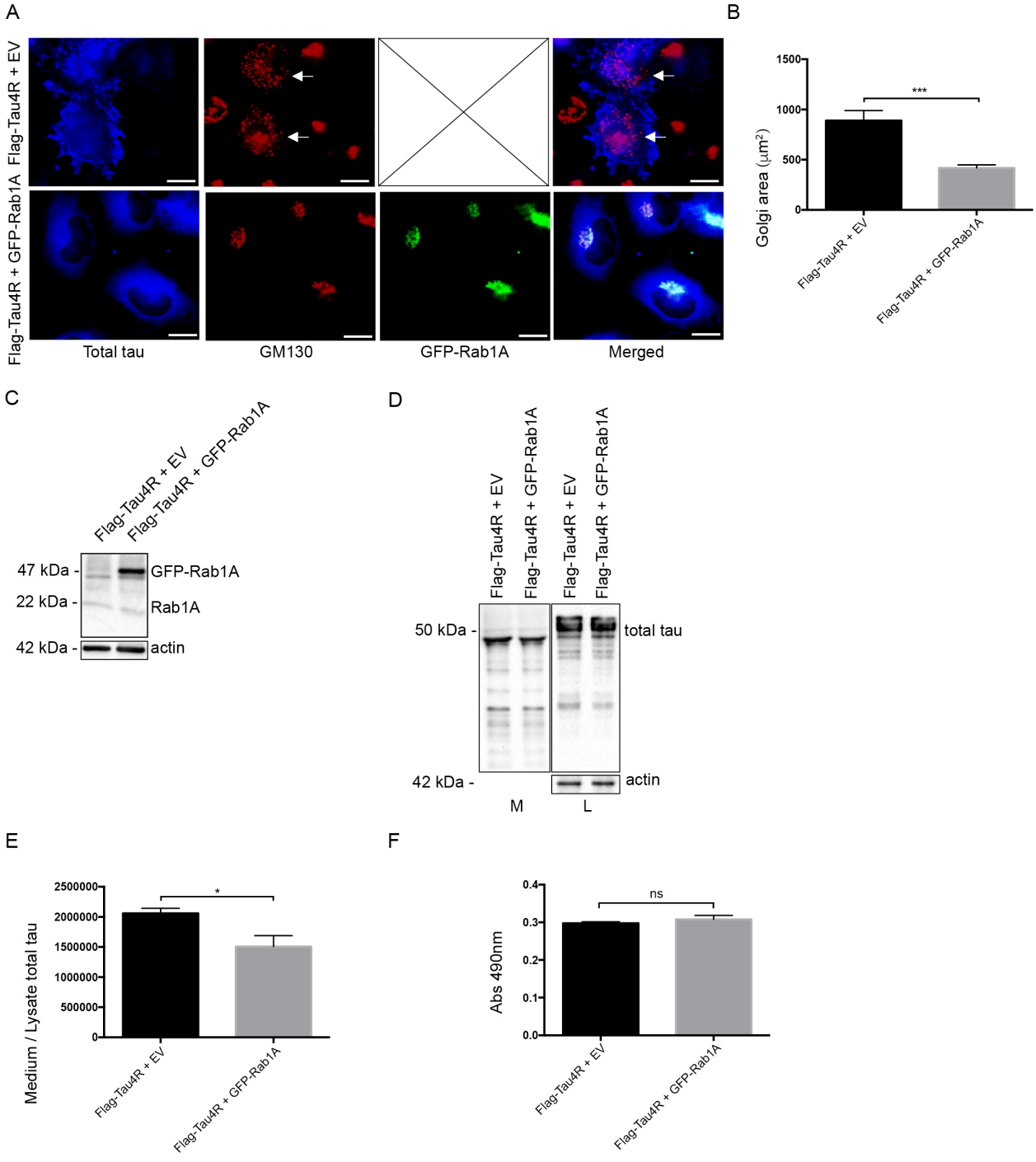


Fig 4 I

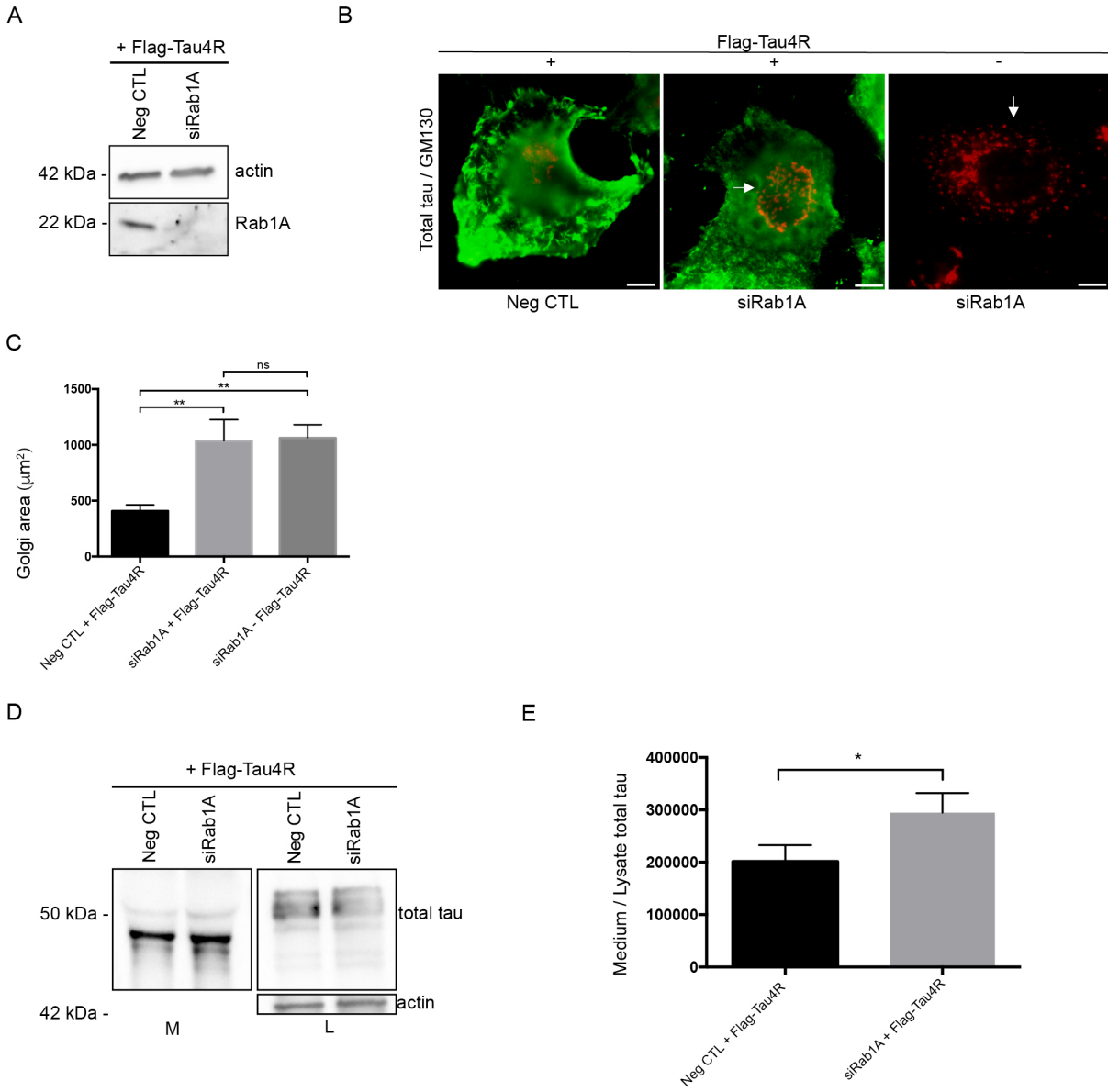


Fig 5 I

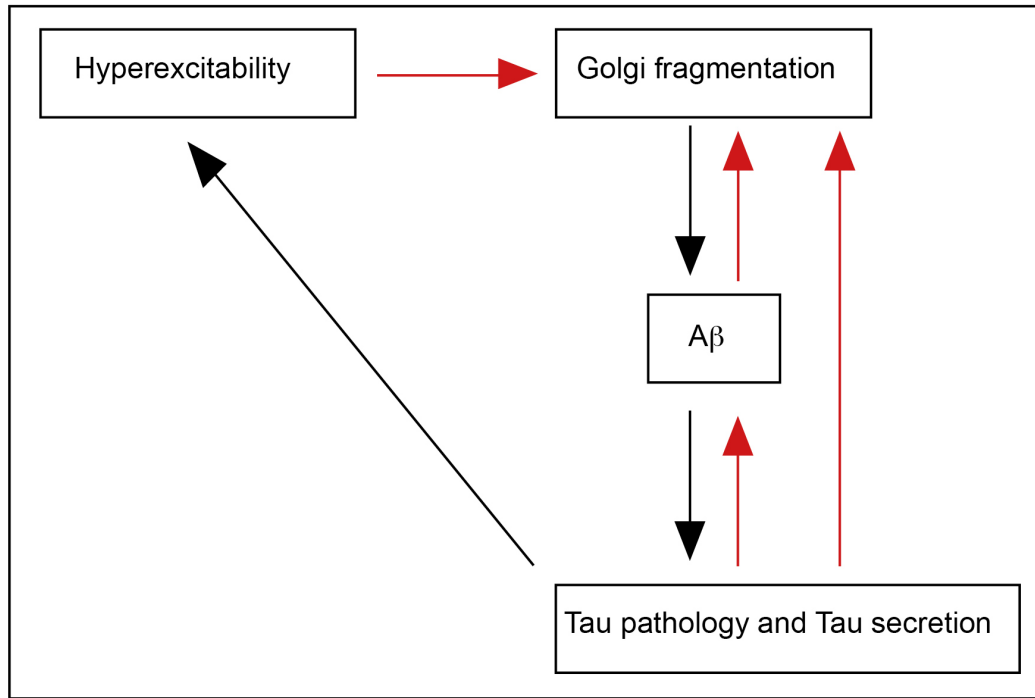


Fig 6 I

V. Conclusions

V.1 Conclusions de l'étude « Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion » publiée en 2012 dans PlosOne

Dans cette étude, nous avons démontré que la protéine tau humaine surexprimée était sécrétée dans les cellules Hela, indépendamment de la mort cellulaire, par une voie non conventionnelle de sécrétion. La protéine tau sécrétée était clivée dans sa partie C-terminale. De plus, cette protéine tau sécrétée était moins phosphorylée que la protéine tau intracellulaire. Dans cette étude, nous avons également montré que la surexpression de la forme hyperphosphorylée de tau, et de la forme clivée de tau au site D421 augmentaient la sécrétion de tau dans les cellules Hela.

Dans cette étude, la tau sécrétée par les cellules Hela a pu être immunoprécipitée à partir du milieu de culture, sans aucun détergeant, ce qui indiquait que la tau sécrétée n'était pas associée à des vésicules ou des exosomes. Une ultracentrifugation du milieu a confirmé que la tau détectée dans le milieu de culture était majoritairement libre. Nos résultats additionnés à la littérature existante ont ainsi indiqué que tau empruntait plusieurs voies différentes de sécrétion, comme c'est le cas pour d'autres protéines dans les maladies neurodégénératives.

Nos résultats ont démontré que le clivage de tau en position D421 augmentait sa sécrétion. Lorsque les cellules Hela sont traitées avec un inhibiteur de caspase 3, une diminution significative de la protéine tau sauvage est observée.

Lorsque nous avons mimé l'hyperphosphorylation intracellulaire, la sécrétion de tau était augmentée. Cependant, nous avons découvert que la tau dans le milieu de culture était majoritairement déphosphorylée comparée à la tau intracellulaire. Les épitopes pathologiques comme ceux reconnus par les anticorps AT8 et PHF-1 sont également déphosphorylés dans le milieu. Plusieurs études sur la sécrétion de tau ont par la suite également confirmé cette observation.

V.2 Conclusions de l'étude « Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons » publiée en 2014 dans Scientific Reports

Dans cette étude, nous avons démontré que la sécrétion de tau, dans les cultures primaires de neurones corticaux de souris, augmentait sous l'influence de différentes insultes. Ainsi, la déprivation de nutriments et l'inhibition de la fonction lysosomale étaient à l'origine de l'augmentation de la sécrétion de tau dans notre étude. Cependant, l'effet le plus significatif a été observé lorsque ces deux phénomènes sont additionnés. Autre fait intéressant, le profil de la protéine tau sécrétée était différent d'une insulte à l'autre. De plus concernant les modifications post-traductionnelles, la protéine tau sécrétée est aussi partiellement déphosphorylée. Nos observations ont indiqué que les insultes comme la déprivation de nutriments ou le dysfonctionnement lysosomal, observés dans plusieurs maladies neurodégénératives, peuvent augmenter la sécrétion de tau et donc contribuer à la propagation de la pathologie de tau dans le cerveau.

Nos résultats ont par ailleurs démontré, qu'un flux autophagique complet n'était pas nécessaire pour induire une augmentation significative de la sécrétion de tau dans des neurones privés de nutriments. Le fait que la protéine tau n'était pas enrichie dans les vacuoles autophagiques et que l'inhibition du flux autophagique seul n'avait pas d'impact majeur sur la sécrétion de tau, nous ont indiqué que la sécrétion de tau n'était pas sous dépendance de la voie autophagique, mais plutôt de l'absence de nutriments à l'origine de changements du trafic de protéines à la membrane.

Le fait que l'inhibition de la fonction lysosomale ait induit une petite augmentation de la sécrétion de tau, que l'absence de nutriments ait induit une augmentation importante et que la combinaison des deux ait accru le phénomène, nous ont indiqué que la tau était sécrétée par différentes voies qui peuvent s'additionner. Ainsi, le recrutement de plusieurs voies de sécrétion contribue à une augmentation pathologique de la sécrétion de tau dans le milieu cellulaire.

En l'absence de nutriments, une déphosphorylation partielle de la protéine tau s'est produite dans la cellule. Ce phénomène observé, n'est pas isolé dans la pathologie, puisqu'il a été décrit pour d'autres insultes comme l'induction du stress oxydatif ou l'excitotoxicité. Ces insultes induisent aussi la déphosphorylation de tau dans des modèles animaux *in vivo*, ou dans les cerveaux des patients, en parallèle à des phénomènes d'hyperphosphorylation. Le profil de nos bandes de tau sécrétée, indique que différentes espèces de tau sont relarguées dans le milieu. Un groupe est phosphorylé et l'autre déphosphorylé. Il faut aussi noter que la proportion de chacun des groupes diffère selon l'insulte produite. Plus important, nous avons démontré que le contexte cellulaire favorise la sécrétion de tau.

V.3 Conclusions de l'étude « Golgi fragmentation increases tau secretion » Soumis dans The Journal of Neuroscience en avril 2016

Pour explorer le lien entre l'appareil de Golgi et la sécrétion de la protéine tau, dans un premier temps, nous avons démontré que l'hyperexcitabilité des neurones était à l'origine de l'augmentation de la sécrétion de tau dans les neurones corticaux de rats. Cette hyperexcitabilité a entraîné l'activation de la calpaïne suivie de l'activation de la cdk5, à l'origine de la fragmentation de l'appareil de Golgi en aval. Par la suite, lorsque nous avons diminué cette fragmentation à l'aide d'un inhibiteur de l'activité de cdk5, l'olomoucine, nous avons observé une diminution significative de la sécrétion de la protéine tau dans le milieu.

Dans cette étude, nous avons également étudié l'implication de l'expression de la protéine rab1A sur la morphologie du Golgi dans les cellules Hela. Dans un premier temps, une diminution de l'expression de rab1A a entraîné une fragmentation du Golgi. L'analyse du milieu a révélé que cette fragmentation était corrélée avec une augmentation de la sécrétion de tau sauvage humaine surexprimée. La surexpression de rab1A a permis d'empêcher la fragmentation du Golgi. Ce phénomène a eu pour conséquence directe une diminution de la sécrétion de la protéine tau.

Nos résultats ont donc mis en lumière la relation particulière entre la morphologie du Golgi, sa dynamique, et la sécrétion de la protéine tau. Nos travaux démontrent que la voie cdk5 et rab1A pourraient être deux voies impliquées dans le processus de propagation de la

pathologie en modulant la morphologie de l'appareil de Golgi. De plus ces voies sont modulables dans la cellule et s'avèrent donc être des cibles potentielles de régulation pour la MA. Notre étude est donc la première dans le domaine à démontrer des mécanismes cellulaires modulables impliqués dans la sécrétion de la protéine tau .

VI. Discussion et Perspectives

VI.1 La sécrétion de tau et sa caractérisation : les données de 2012 à avril 2016

A partir de 2012, de très nombreux laboratoires se sont intéressés à la propagation de la pathologie de tau et ont produit une abondance de résultats. La sécrétion active de la protéine tau et indépendante de la mort cellulaire, s'est confirmée dans d'autres lignées cellulaires non-neuronales et neuronales : SH-SY5Y, Hela, N1-E115, iCell, culture primaire de neurones murins (341, 342, 344, 374, 375).

VI.1.1 Clivage et phosphorylation de la protéine tau sécrétée

Concernant les modifications post-traductionnelles de la protéine tau sécrétée, la forme pleine longueur comme la forme clivée ont toutes les deux été observées *in vitro*. La tau sécrétée endogène à partir des cultures primaires de neurones , des SH-SY5Y et des iCell est pleine longueur comme la tau surexprimée sécrétée dans les cellules HEK293T (341, 342). La tau surexprimée sécrétée par les M1C et les cellules Hela est clivée dans sa partie C-terminale (337, 344). Dans les HEK293T, plusieurs fragments de tau sont observés dans le milieu de culture, la bande de 17kDA étant la prédominante (345). Un autre groupe a également observé que la tau sécrétée est tronquée dans sa partie C-terminale dans le milieu des cellules N2A et dans des cellules souches induites pluripotentes dérivées en neurones corticaux humains (376).

Dans notre première publication, l'état de phosphorylation de la tau sécrétée a été analysé pour la première fois. Dans les cellules Hela, la tau sécrétée est déphosphorylée à plusieurs sites comparé à la tau intracellulaire (T181, S199, S202, T205, T212, S214, T217, T231, S235, S262, S396, S404, S409, et S422) (344). Dans les cellules HEK293T, le site T181 est phosphorylé similairement pour la tau intracellulaire et la tau extracellulaire

indiquant que dans ces cellules, il ne se produit pas de déphosphorylation à ce site là. La tau endogène sécrétée par les neurones corticaux est aussi déphosphorylée majoritairement en conditions pathologiques comme par exemple lorsque l'autophagie observée dans la MA est reproduite sur les cellules (375). De manière intéressante, nous rappelons que l'addition de tau déphosphorylée dans le milieu de culture de cellules induit une activation des récepteurs muscariniques M1 et M3, à l'origine d'une augmentation du calcium intracellulaire précédemment rapportée comme contribuant au développement de la MA (377, 378). Il reste à déterminer si la tau déphosphorylée est toxique ou non de manière directe. De même que pour les cellules HEK293T, le site de phosphorylation T181 est aussi détectable pour la protéine tau extracellulaire issue des neurones (341, 342). Nous mentionnons que le site T181 est l'un des seuls sites de phosphorylation pathologique détectable dans le liquide céphalo rachidien des patients de la MA. Lorsque la protéine tau est surexprimée dans les cellules M1C, la protéine tau sécrétée est associée aux exosomes. Cet ensemble de protéine tau associée aux exosomes est phosphorylé à divers épitopes détectés dans le cerveau des personnes atteintes de MA (AT180, AT100, AT270, AT8 et PHF-1). Il faut noter que cette tau associée aux exosomes est également phosphorylée au site T181 (330). Le profil de la phosphorylation de tau sécrétée dépend donc du type cellulaire et de l'insulte que subit la cellule.

VI.1.2 La sécrétion de tau in vitro : influence des isoformes, mutations et modifications post-traductionnelles intracellulaires

Différentes isoformes de tau sont sécrétées par des lignées neuronales et non-neuronales. En 2010, une étude reporta que la partie N-terminale de tau est nécessaire puisque qu'une forme tronquée de tau contenant le C-terminal (211-441 a.a) n'est pas sécrétée par les cellules NB2a/d1 (338). Dans cette même étude, l'équipe démontre que l'exon 2 exerce un effet inhibitoire sur la sécrétion de tau. Ces observations n'ont pas été confirmées, puisque les isoformes 3R2N et 4R2N sont sécrétées dans les cellules HEK293T (342). Par ailleurs, dans cette étude, 3R2N est plus sécrétée que 3R0N, 4R0N et 4R2N. Cette dernière forme demeurerait la moins sécrétée. Nous concluons que la sécrétion de tau est régulée différemment selon la lignée cellulaire. Les mutations de tau, liées au DLFT, influencent également différemment la sécrétion de tau. Ainsi, la mutation $\Delta K280$ n'affecte pas la sécrétion de tau; tandis que les

mutations P301L/P301S/R406W diminuent sa sécrétion dans les cellules HEK293T (341, 342).

Dans notre premier article de doctorat, nous avons démontré que les modifications post-traductionnelles de tau influencent également aussi sa sécrétion (344). Ainsi, dans les cellules Hela, la surexpression d'une forme hyperphosphorylée de tau ou d'une forme clivée au site de la caspase 3, augmente sa sécrétion. Dans la MA, l'activité des caspases est un événement précoce. Puisque nous avons démontré que la forme de tau clivée au site de la caspase 3 est plus sécrétée que la forme sauvage, alors nous déduisons que la sécrétion de tau est également augmentée au stade initial de la pathologie (379).

Dans les cellules Hela, notre première étude montre que la protéine tau est clivée avant d'être sécrétée. Nous avons démontré que le clivage était bien intracellulaire en incubant de la protéine tau recombinante dans le milieu pour vérifier la possibilité d'une activité protéolytique extracellulaire. Nous n'avons pas vu de clivage de la tau recombinante donc nous avons conclu que le clivage en C-terminale précédait le processus de sécrétion (344). Les protéases impliquées dans le clivage de tau restent toujours à identifier. De manière très intéressante, une équipe a récemment démontré que la quantité de tau présynaptique, tronquée de sa partie C-terminale et relarguée aux synapses corticaux chez les patients atteints de MA, est supérieure à la quantité de tau présynaptique clivée en C-terminale chez les patients témoins (380).

VI.1.3 Autres modifications post-traductionnelles de tau pouvant contribuer à la sécrétion

Outre la phosphorylation de tau, il existe de très nombreuses autres modifications post-traductionnelles, comme par exemple : la glycosylation, l'ubiquitinylation, la glycation, le clivage ou la troncation, la nitration, la polyamination, la sumoylation, la prolyl-isomerization, l'acétylation ou l'oxydation (188, 230, 381–383). Ces autres modifications post-traductionnelles sont également à explorer pour la sécrétion de tau et les stratégies thérapeutiques à développer dans la MA. Nous en discuterons ici deux, potentiellement reliées à nos résultats de thèses : le clivage et la glycosylation.

Dans notre première publication, nous avons démontré que la surexpression d'une forme de tau, tronquée au site de la caspase 3, augmentait la quantité de tau extracellulaire. Dans le cerveau post-mortem des patients atteints de la MA, comparés aux cerveaux témoins, il existe une augmentation des ARN messagers d'une multitude de caspases dont la caspase 3 (384). Plus intéressant, plusieurs caspases dont la caspase 3 ont été isolés dans la fraction synaptosomale dans le cerveau de patients atteints de MA. Aux synapses, ces caspases sont enrichies et peuvent jouer de nombreux rôles dans la pathologie par leur localisation pré ou postsynaptique (385, 386). Le clivage de tau par les caspases étant impliqué dans des événements précoces dans la MA (309), nous émettons donc l'hypothèse que la colocalisation de tau et des caspases aux synapses peut favoriser le clivage de tau et amplifier le phénomène de sécrétion et de propagation au stade précoce de la pathologie. Puis, la troncation de tau par les caspases provoque leur agrégation comme démontré dans plusieurs études (387). Les fragments de la protéine tau clivée par les caspases ont été, par ailleurs, localisés dans les NFTs (386). Il existe donc plusieurs observations qui nous laissent penser que les caspases peuvent influencer la sécrétion de tau aux synapses.

La phosphorylation est régulée par les kinases et les phosphatases mais la phosphorylation dépend également de la O-glycosylation (188, 381, 382). La O-glycosylation est la deuxième modification post-traductionnelle de tau après la phosphorylation. Dynamique et réversible, elle est caractérisée par l'addition d'un résidu O-GlcNAc (O-N-acétylglucosaminylation) par la O-GlcNAc transférase sur les résidus sérine et thréonine (388, 389). Cette modification est connue comme négativement corrélée à la phosphorylation (390–392). Fait intéressant, une glycosylation aberrante pourrait être impliquée dans la dégénérescence cellulaire en promouvant l'hyperphosphorylation de tau par cdk5 (393). Nous montrons dans notre dernière étude que l'activation de cdk5 favorise la sécrétion de tau, en fragmentant le Golgi. En affectant la phosphorylation de tau, la O-GlcNAc est donc susceptible de modifier la fonction de tau mais aussi sa localisation. Il est connu que la tau déphosphorylée est plus associée aux membranes, ce qui pourrait la rendre plus disponible pour accéder à certaines voies de sécrétion spécifiques (394). Nos résultats et ceux des autres laboratoires démontrent par ailleurs que la protéine tau sécrétée est fortement déphosphorylée. Dans notre seconde étude, nous avons également mis en évidence l'existence d'une population

de protéine tau déphosphorylée intracellulaire plus importante lors de stress observés dans la MA. La O-GlcNAc serait donc une modification post-traductionnelle très intéressante à explorer dans le cadre de la sécrétion de tau et une cible potentielle pour la moduler.

VI.1.4 Localisation de la sécrétion et de l'endocytose de tau

En conditions normales, la protéine tau est enrichie dans l'axone des neurones. Ainsi donc, elle peut être relarguée à la terminaison présynaptique. Les MVBs sont rarement trouvés dans l'axone des neurones en conditions normales, et donc il est fort improbable que tau puisse être relarguée par les exosomes via les MVBs dans la terminaison présynaptique (395). D'un autre côté, les autophagosomes ont été observés dans la portion distale des axones comme les endosomes (77). La fusion des autophagosomes avec les endosomes conduit à la formation d'amphisomes contenant des exosomes (voie 4, Figure6.) (396). Ainsi, la tau associée aux exosomes peut être relarguée par la fusion des amphisomes avec la membrane plasmique à la terminaison présynaptique. La tau libre peut aussi être relarguée par la fusion des autophagosomes avec la membrane plasmique (voie 3, Figure6.). Une autre possibilité est que la tau sécrétée pourrait être issue de la rupture des exosomes. Ce groupe de tau libre pourrait par la suite être endocyté à la terminaison présynaptique, et par la suite relâché par le recyclage des endosomes comme démontré pour l'alpha-synucléine (397, 398). Ainsi, l'alpha-synucléine extracellulaire est endocytée, transportée par les endosomes précoces et recyclée à la membrane plasmique pour être relarguée dans l'espace extracellulaire. Un schéma similaire peut être envisagé pour la sécrétion de tau à la terminaison présynaptique. L'association de tau avec les membranes du Golgi en conditions normales pourrait aussi soutenir l'hypothèse selon laquelle des vésicules issues du Golgi pourraient voyager le long des axones et délivrer tau à la terminaison présynaptique (154). Ces vésicules pourraient fusionner directement avec la membrane plasmique ou indirectement avec les endosomes (voies 8 et 9, Figure 6.).

Durant la progression de la maladie d'Alzheimer, la protéine tau s'accumule dans le compartiment somato-dendritique (257). Cette redistribution cellulaire de la protéine, pourrait permettre à tau d'accéder à différentes voies non-conventionnelles de sécrétion, soutenant également l'accumulation de tau dans le liquide céphalo rachidien des patients à des stades

précoces de la pathologie. Par exemple, les MVBs sont 50 fois plus nombreux dans le soma des cellules que dans leur axone. Ainsi donc, la capture de tau par les MVBs dans le compartiment somato-dendritique est plus probable que la capture de tau dans l'axone (voie 1, Figure6.) (395). Les lysosomes sont aussi plus nombreux dans le soma des cellules augmentant la possibilité pour tau d'être sécrétée par les lysosomes sécrétoires (voie2, Figure6.). D'ailleurs, chez les souris tau transgéniques, les lysosomes sont plus nombreux et plus activés (399). Le nombre des autophagosomes dans le soma augmente dans la MA, favorisant la possibilité pour tau d'être sécrétée par une voie impliquant cette structure (voie 3 et 4, Figure6.) (85). Le laboratoire a précédemment démontré que dans le cerveau des malades Alzheimer et chez les souris tau transgéniques JNPL3, la tau hyperphosphorylée s'accumule préférentiellement à la surface du RE (365). Ces observations mettent en évidence que la protéine tau peut être sécrétée par des voies non conventionnelles de sécrétion à partir du RE (voie 5-9, Figure6.). En conclusions, plusieurs des voies de sécrétion non conventionnelles peuvent contribuer à la détection de l'augmentation de tau sécrétée dans le LCR des patients de la MA.

La pathologie de tau peut se propager de manière trans-synaptique (347, 348, 356). Cela implique que la protéine tau est relarguée à la terminaison présynaptique et par la suite endocytée par le neurone postsynaptique. Lorsque la protéine tau commence à s'accumuler dans le compartiment somato-dendritique, tau peut être relarguée par ce compartiment et cela peut contribuer à une propagation locale de la pathologie de tau. Une amplification de la pathologie de tau à la synapse peut avoir lieu quand tau sécrétée par le compartiment somato-dendritique est endocytée par la terminaison présynaptique. En accord avec ce scénario, la tau hyperphosphorylée et mal conformée s'accumule aux terminaisons présynaptiques et postsynaptiques dans le cerveau des malades (400). De plus, il a été démontré que tau peut être endocytée par le compartiment somato-dendritique et la terminaison présynaptique (346). Il faut remarquer que l'amplification de la pathologie de tau aux synapses peut exacerber les dysfonctions synaptiques observées au stade précoce de la maladie d'Alzheimer. La propagation trans-synaptique de la tau sauvage humaine de cellule en cellule a récemment été démontrée grâce à l'utilisation de chambre microfluidique (356). Dans cette même étude, la propagation trans-synaptique de la tau sauvage humaine de région en région a été démontrée

in vivo dans le cerveau de rats. Dernièrement, une équipe a mis en évidence que les contacts synaptiques entre neurones favorisent la propagation de la pathologie de tau de cellule en cellule (401).

VI.1.5 La voie non conventionnelle de sécrétion des ectosomes/exosomes et les vésicules extracellulaires

Dans les cellules Hela, la sécrétion de tau surexprimée est demeurée inchangée lorsque nous avons incubé les cellules avec de la brefeldin A, une drogue connue pour bloquer la voie de sécrétion conventionnelle du RE au Golgi (344).

A ce jour, la voie non conventionnelle, la plus analysée, empruntée par tau est la voie exosomale. La tau sécrétée est détectée dans le milieu des cellules, libre ou incluse dans des vésicules extracellulaires composées de membrane et appelées exosomes et ectosomes (402). Lorsqu'elles bourgeonnent de la membrane plasmique, elles sont appelées ectosomes et lorsqu'elles sont issues de l'exocytose de corps multi vésiculaires ayant fusionné avec la membrane, elles sont appelées exosomes (403–405). Elles diffèrent par ailleurs par la taille. Ainsi, les exosomes sont de petites vésicules de 40 à 100nm, tandis que les ectosomes ont une taille comprise entre 50 et 1000nm (406–408). Plusieurs études, dont les nôtres, démontrent que la tau endogène sécrétée dans les cultures primaires de neurones corticaux est majoritairement libre (341, 342, 344, 345). D'autres équipes ont également, par la suite, confirmé que tau sécrétée était majoritairement libre mais ont aussi précisé que 7% était associée à des ectosomes et 3% associée aux exosomes dans les cultures primaires de neurones (374). Une équipe a vérifié que tau se localisait à l'intérieur des exosomes et non à la surface cellulaire. Les conclusions sont similaires pour les neuroblastomes N1-E115. Comme précédemment mentionné, dans les cellules M1C et COS-7 la tau surexprimée est relarguée via des exosomes et microvésicules (330, 345). Dans les HEK293, l'isoforme 4R2N est libre, alors que la forme 3R0N est à la fois sécrétée dans un groupe libre et un groupe associé aux microvésicules (341, 345). Dans les cellules Hela, nous avons démontré que la tau sécrétée 4R0N est majoritairement libre (344). Ces résultats nous indiquent que la voie de sécrétion de tau dépend du type cellulaire et des isoformes exprimées. Plusieurs études dont les nôtres ont prouvé que la protéine tau sécrétée par des cellules neuronales et non-neuronales est

majoritairement libre. La tau cytosolique et membranaire peuvent donc être relargués librement dans l'espace extracellulaire.

Les vésicules extracellulaires jouent un rôle important dans la communication intercellulaire et dans le transfert de matériel d'une cellule à une autre. Une hypothèse propose que les vésicules soient les transporteurs des protéines mal conformées dans les maladies neurodégénératives comme les NFTs et A β . Plusieurs observations soutiennent l'implication des vésicules extracellulaires dans la MA. Ainsi, les chercheurs ont identifié dans les vésicules : la présence d' A β , un enrichissement des fragments c-terminaux de l'APP, ainsi que le complexe γ -sécrétase et la protéine tau (409–418). Les chercheurs ont aussi trouvé à la surface des vésicules des éléments favorisant l'interaction avec le peptide A β tels que les glycosphingolipides (414, 415, 417). Cette observation soutient donc la théorie selon laquelle le peptide A β peut être encapsulé dans les exosomes puis relargué dans l'espace extracellulaire. Les vésicules pourraient ainsi soit jouer un rôle protecteur en encapsulant les protéines mal conformées et en les évacuant de la cellule, ou au contraire favoriser la toxicité de ces dernières en les diffusant. Dernièrement, plusieurs observations très intéressantes révèlent que de très nombreuses vésicules sont présentes dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de la MA. De plus, la concentration de ces vésicules corrèle avec l'atrophie de l'hippocampe, et le niveau de tau total et de tau phosphorylé retrouvé dans le liquide céphalo rachidien (419). Autre élément intéressant, dans les vésicules les plus grosses, des chercheurs ont trouvé de la tau hyperphosphorylée sous forme d'oligomères en plus de l'A β (330, 345). Ainsi les vésicules extracellulaires se présentent comme un excellent biomarqueur de la pathologie mais également comme une piste sérieuse à explorer pour la propagation de la pathologie de tau.

Bien que nous ayons observé une tau extracellulaire majoritairement libre, nous ne pouvons pas exclure que les vésicules extracellulaires encapsulent les espèces les plus propices à se propager ou à induire des effets délétères sur les neurones. C'est donc une piste qui reste à approfondir dans l'étude de la propagation de la pathologie de tau.

VI.2 Les modèles d'étude de la sécrétion de tau : de l'*in vitro*, à l'*in vivo*, aux modèles humains

Dans notre introduction, nous avons fait l'observation que les formes de tau sécrétée différaient d'un modèle d'étude à l'autre tant au point de vue du clivage, de l'agrégation que du type d'insulte provoqué. Durant notre projet de recherche, nous avons travaillé sur des modèles *in vitro* avec des cellules humaines de type Hela ou des cultures primaires de neurones de souris et de rats. Nous avons trouvé plusieurs similarités entre ces modèles. Ainsi plusieurs insultes cellulaires observées lors de la MA sont à l'origine de la sécrétion de tau. De plus, quelque soit le type cellulaire ou l'insulte, la tau sécrétée était toujours déphosphorylée et tronquée dans sa partie C-terminale. De même, en condition de stress, la population de tau intracellulaire était partagée entre formes phosphorylées et non phosphorylées. Dans l'ensemble de nos modèles, nous avons observé que la tau sécrétée était majoritairement libre, non associée aux exosomes. L'appareil de Golgi s'est avéré être une organelle clef impliquée dans la sécrétion de la protéine tau dans l'ensemble de nos modèles. Ainsi, dans notre seconde étude, lors de l'incubation des neurones dans l'EBSS et la leupeptine, nous avons également observé une fragmentation de l'appareil de Golgi corrélée avec une augmentation de la sécrétion de tau (donnée non publiée). En conclusions, la morphologie du Golgi et son activité sont étroitement liés à la sécrétion de la protéine tau dans différents modèles. La fragmentation du Golgi, induite par différentes voies dans les cellules humaines ou murines est réversible dans ces modèles grâce à un ciblage spécifique de l'activité cdk5 ou de rab1A.

Bien que l'ensemble des phénomènes décrits soit observé dans le cerveau des patients, il demeure essentiel d'explorer les mécanismes clefs de nos études dans des modèles *in vivo*. Nous proposons comme perspectives d'analyser l'état du Golgi dans les modèles *in vivo* de propagation de la pathologie, comme dans les souris rTgTauEC. Nous faisons l'hypothèse que le Golgi est fragmenté durant le vieillissement de ces souris, et que la propagation de tau serait diminuée ou ralentie en neutralisant cette fragmentation par l'administration d'inhibiteurs de l'activité de cdk5 ou par injections locales de lentivirus permettant la surexpression de rab1a.

Les neurones humains différenciés à partir de cellules souches de patients pourraient également s'avérer être un modèle de choix puisqu'ils permettraient d'établir des liens entre le

degré de cognition des patients et les différentes modifications post-traductionnelles de tau influençant le développement de la pathologie. En effet, avec le développement de la recherche sur les cellules souches, il est désormais possible de reprogrammer des fibroblastes prélevés sur les patients puis de les différencier en lignée nerveuse désirée. Ainsi, il serait envisageable d'étudier le phénomène de sécrétion et d'endocytose de la protéine tau directement à l'aide des neurones issus de chaque patient. Les neurones humains permettraient donc d'évaluer à long-terme la toxicité induite par la protéine tau et sa relation à la pathologie, au dysfonctionnement neuronal et à la neurodégénérescence. Nous proposons donc comme expériences complémentaires de vérifier les voies de sécrétion activées dans les modèles in vivo ou sur les neurones humains issus de la différenciation des cellules souches. En 2012, un laboratoire a utilisé le modèle des cellules iCell® pour étudier la sécrétion de tau (341). Puis en 2015, trois laboratoires ont également utilisé des neurones corticaux dérivés de l'induction de cellules souches pluripotentes pour analyser respectivement les fragments de tau sécrétés et les espèces de tau endocytées (314, 376, 420). Concernant la sécrétion de tau, trois laboratoires ont identifié des formes différentes de tau sécrétés, pleine longueur en 2012 (341), tronquée de la partie C-terminale en 2015 (314, 420). Il faut donc demeurer prudent quand à la manière d'obtenir des neurones différenciés à partir de cellules souches puisque c'est une technique récente et complexe, qui requiert encore de l'optimisation et de l'harmonisation dans les procédures.

VI.3 La contribution toxique de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer

Personne ne sait si la protéine tau possède des propriétés toxiques en soi et comment sa potentielle toxicité pourrait contribuer à la transmission intercellulaire de la pathologie.

Notre étude a révélé que la tau sécrétée était essentiellement déphosphorylée. D'autres publications soutiennent cette information. Il reste cependant à déterminer si cette forme de tau est toxique ou plus propice à la propagation de la pathologie en initiant l'hyperphosphorylation intracellulaire de tau par exemple. L'état de phosphorylation de tau détermine son association aux membranes. Ainsi, une étude récente a prouvé que la protéine tau déphosphorylée était associée à la membrane plasmique (394). Dans une précédente étude

publiée dans le laboratoire, l'équipe a montré que la tau hyperphosphorylée était retrouvée dans la fraction enrichie en membranes du réticulum endoplasmique alors que la tau déphosphorylée était retrouvée dans la fraction enrichie en membranes de l'appareil de Golgi (154). Ces différences de localisation de la protéine tau pourraient être à l'origine des différentes voies de sécrétion empruntées par tau ou encore de différentes vitesses de propagation. Ces observations nous permettent également d'émettre l'hypothèse que lors de la fragmentation du Golgi, la protéine tau déphosphorylée est plus facilement sécrétée par la dispersion des vésicules issues du Golgi.

Nous proposons donc comme expériences futures de comparer la toxicité de la protéine tau déphosphorylée et hyperphosphorylée en analysant les récepteurs activés à la surface membranaire des neurones par exemple. Cela nous permettra de comprendre si certaines voies sont préférentiellement activées comparées à d'autres dans le processus de propagation et de neurodégénérescence.

Récemment, une équipe a étudié la contribution de la conformation de la protéine tau au phénomène de propagation de la pathologie (314). Cette étude a été produite dans le modèle des neurones humains de patients issus de l'induction de la différenciation des cellules souches pluripotentes. A partir de tau recombinante humaine, cette équipe a produit des monomères, des oligomères et des fibrilles de tau. En présence des neurones, ils ont tout d'abord observé une endocytose des formes monomériques et oligomériques de tau, et non des formes fibrillaires de tau. Ensuite, ils ont démontré que les oligomères de tau endocytés initiaient l'accumulation de la tau hyperphosphorylée dans la cellule. Ceci s'accompagnait d'une dégénérescence des neurites, d'une perte des synapses, d'une homéostasie calcique aberrante, de problèmes de neurotransmission et de mort neuronale (314). Il nous reste à déterminer l'état de conformation de tau intracellulaire et extracellulaire dans nos modèles d'étude.

VI.4 La relation entre A β et tau dans la maladie d'Alzheimer : l'appareil de Golgi, un carrefour de la propagation de la pathologie et une cible potentielle

VI.4.1 L'appareil de Golgi, un carrefour de la propagation de la pathologie de tau et de la pathologie amyloïde

Une question récurrente s'impose lorsque nous travaillons sur un marqueur neuropathologique de la MA. Les plaques amyloïdes et les NFTs augmentent et se propagent dans la pathologie. Il reste cependant à établir s'il existe une interaction entre les deux et si un des ces marqueurs précède et favorise l'apparition de l'autre.

Plusieurs équipes se sont penchées sur la question. In vitro, dans le modèle des neurones humains différenciés à partir de cellules souches, une équipe a montré que A β augmente la quantité de tau extracellulaire seulement lorsque les cellules sont compromises (376). Lorsque les neurones sont intacts, le niveau de tau extracellulaire ne varie pas. Cette dernière observation a également été décrite in vitro, dans des neurones de rats en culture deux ans auparavant (421). Dans des cultures primaires de neurones humains, la tau humaine sécrétée ajoutée au milieu de culture est capable in vitro d'augmenter la production de A β . Inversement, la neutralisation in vitro et in vivo de la tau sécrétée diminue le niveau de A β (420). In vivo, une équipe a croisé une souris transgénique rTgTauEC avec une souris APP/PS1. Ils ont démontré que les dépôts amyloïdes dans le cortex induisent une augmentation de la vitesse de propagation de tau, une augmentation de la propagation distale de tau et une augmentation de la perte neuronale induite par tau. Leurs résultats supportent donc l'hypothèse que l'amyloïde cortical accélère la propagation des NFTs dans le cortex et amplifie les dommages aux neurones associés aux NFTs (422). Cependant, les mécanismes sous-jacents à ces observations demeurent inconnus.

Dans notre dernière étude, nous avons montré qu'une hyperexcitabilité neuronale est à l'origine de la fragmentation de l'appareil de Golgi et de la sécrétion de tau. Fait très intéressant en 2013, une étude a montré que l'accumulation de plaques amyloïdes dans le

modèle de souris transgénique APP^{swe}/PS1 Δ E9 et dans des cultures de tissus a conduit à la fragmentation du Golgi. Cette étude a par ailleurs démontré que la fragmentation du Golgi dans la MA est causée par la phosphorylation de protéines structurelles comme la GRASP65. Dans cette étude, l'inhibition de la cdk5 et l'expression de la forme non phosphorylable de GRASP65 a permis la recompaction de l'appareil de Golgi. L'autre donnée nouvelle qu'apporte cette étude est le fait que la fragmentation du Golgi augmente également la production de l'amyloïde-bêta via la voie cdk5 (137). A la lumière de cette étude et de nos résultats, on observe donc des mécanismes communs favorisant l'apparition des marqueurs neuropathologiques et contribuant à leur développement. L'appareil de Golgi apparaît donc clairement comme une plateforme convergente entre les différents marqueurs neuropathologiques.

Il serait donc intéressant de vérifier si l'addition de différentes conformations d'A β est susceptible d'augmenter la sécrétion de la protéine tau dans notre modèle pour comprendre la séquence d'amplification pathologique. En faisant la synthèse des événements observés dans les modèles pour la maladie d'Alzheimer, l'appareil de Golgi apparaît donc comme une cible thérapeutique innovante et prometteuse.

VI.4.2 Cdk5 une piste pour moduler l'appareil de Golgi dans la pathologie de tau et la pathologie amyloïde

La cdk5 est un membre de la famille des cyclines dépendantes kinases connue pour réguler le cycle cellulaire (423–425). Cdk5 cependant ne possède pas cette fonction. Son activité est prépondérante au système nerveux central. Cdk5 est la kinase la plus exprimée dans les neurones matures (426–429). Dans son rôle physiologique, cdk5 est impliquée dans le développement des neurones, dans leur signalisation cellulaire comme la survie et la mort, dans la plasticité synaptique, mais aussi dans la phosphorylation aux sites sérines/thréonines des protéines du cytosquelette comme les neurofilaments ou la protéine tau. Comme pour les autres cyclines dépendantes kinases, cdk5 nécessite une association avec des protéines régulatrices pour l'activer. Ainsi, chez les mammifères, p35 et p39, deux protéines uniquement exprimées dans le système nerveux central, sont nécessaires pour activer cdk5 (426, 427, 430).

Une dérégulation de son niveau d'activité physiologique a été proposée comme responsable d'une variété de désordres observés dans le système nerveux central. La suractivation de la kinase cdk5 est associée à de nombreuses maladies neurodégénératives (76, 233, 431–434). Il est maintenant bien documenté que le stress neuronal ou les facteurs toxiques induisent l'hyperactivation de cdk5. Des concentrations élevées de calcium, détectées dans la MA, activent également la voie pathologique calpaïne capable de cliver p35 en p25. P35 et p25 jouent activement sur l'activité de cdk5 en se complexant avec cette dernière. P35 et p25 ont cependant des propriétés différentes. En effet, p35 est lié aux membranes tandis que p25 se localise plutôt dans le soma et le noyau des neurones. De plus, la demie vie de p25 est grandement supérieure à celle de p35, si bien que p25 va se lier à cdk5 pour l'activer de manière durable. Ainsi le complexe cdk5/p25 est très stable et permet une activation soutenue de cdk5 (165, 234, 435–438). L'hyperactivité de cdk5 favorise la mort cellulaire en dérégulant l'activité mitochondriale.

Plusieurs protéines synaptiques sont des substrats de cdk5, ce qui indique que cdk5 joue un rôle important dans la transmission synaptique. De même, une étude soutient que cdk5 régule l'activité des canaux calciques voltage dépendant et que son association avec p35 est à l'origine d'une diminution de l'activité synaptique (439).

Cdk5 est également impliquée dans la formation des plaques amyloïdes. Ainsi, l'hyperactivité de cdk5 produit des agrégats d'A β . Dans un cercle vicieux, les agrégats amyloïdes sont capables d'augmenter l'activité de cdk5 dans les cultures primaires de neurones (234, 440, 440–442). Dans les cerveaux des patients atteints par la MA, il a été observé une augmentation de l'activité de cdk5 et en parallèle une augmentation du niveau de p25 (432). L'augmentation de l'activité de cdk5 est aussi retrouvée dans plusieurs modèles animaux.

Concernant tau, il a été démontré que cdk5 peut la phosphoryler à de nombreux sites à la fois in vitro et in vivo. Tau possède 16 sites sérine/thréonine suivis de proline et cdk5 en phosphoryle de 9 à 13. Bien que les sites relevés diffèrent d'une étude à l'autre, certains des sites de phosphorylation correspondent à ceux identifiés dans les paires de filaments hélicoïdaux (165, 393, 435, 443–454). Dans le cerveau des patients Alzheimer, il existe une accumulation de p25 responsable de l'augmentation d'activité de Cdk5. Cdk5 est décrit

comme étant une kinase contribuant à l'hyperphosphorylation de la protéine tau sur plusieurs sites et à la formation des NFTs. Dans le cerveau de souris transgéniques p25 ou APP^{swe}/PSEN1 Δ E9, l'augmentation de la protéine p25 et la suractivation de Cdk5 ont été montrées comme corrélant à l'augmentation du niveau de tau phosphorylé. Des immunohistochimies dans les cerveaux des patients ont révélé la présence de cdk5 dans des neurones présentant des NFTs, ainsi qu'à des stades plus précoces (432, 455, 456). Ce dernier élément tend à soutenir l'implication de cdk5 dans des phases précoces de la pathogenèse. Les souris transgéniques p25 présentent également une hyperphosphorylation de tau. Une souris P301L croisée avec une souris transgénique p25 développe des NFTs (233). L'hyperphosphorylation de tau et des neurofilaments lors de la suractivité de cdk5 est à l'origine de problèmes de transport axonal. En conclusions, cdk5 semble donc contribuer à la pathologie de tau et à la formation des NFTs. Il faut cependant demeurer prudent, puisque les sites de phosphorylation relevés in vitro, et in vivo diffèrent d'une étude à l'autre. De plus dans certains modèles in vivo, cdk5 ne phosphoryle pas du tout la protéine tau.

Nous mentionnons aussi que l'activation de cdk5 a été démontré comme contribuant à la fragmentation de l'appareil de Golgi. Cdk5 suractivée, phosphoryle les protéines GRASPS qui se détachent des saccules du Golgi. Ainsi le Golgi perd sa morphologie compacte et se fragmente (137). Nous observons donc que ces deux événements, observés lors de la phase précoce de la MA, sont conjointement associés.

Plus récemment, des chercheurs ont relevé des niveaux anormaux de Cdk5 dans le liquide céphalo rachidien des patients (457). Ces observations soutiennent l'importance de la contribution de cdk5 à la MA.

Il existe donc de nombreuses évidences quand à l'implication de cdk5 dans le processus de neurodégénérescence de la MA. En conséquence, les inhibiteurs de cdk5 se présentent comme d'importants candidats pour les essais cliniques. L'inhibition de l'activité de cdk5 a par ailleurs induit une survie neuronale dans les modèles d'études liés à la pathologie Alzheimer.

VI.4.3 Les protéines Rabs : une piste pour moduler l'appareil de Golgi dans la pathologie de tau et la pathologie amyloïde

Plus de 60 gènes dans le génome humain codent pour la famille des rab GTPases (458). Les protéines rab contribuent à la régulation du trafic de protéines et de membranes grâce à des processus d'endocytose et d'exocytose (459, 460). Chaque protéine rab se lie et hydrolyse un GTP pour s'activer (461). Les protéines rab humaines ont une expression tissu-spécifique et régule le transport des protéines différemment en fonction du type cellulaire. Une mauvaise expression des protéines rab est à l'origine de maladies neurodégénératives (462).

La production d'A β nécessite des phénomènes d'endocytose et de fusion d'endosomes régulés par les rabGTPases. Ainsi la rab5 et la rab7 qui contrôlent la fusion endosomale précoce et tardive sont surexprimées lors du vieillissement (463). Une augmentation et un dysfonctionnement de l'endocytose favorisent la production et l'accumulation de l'A β dans les stades précoces de la maladie (96). Ainsi les endosomes précoces positifs à Rab5 sont plus larges dans les neurones à des stades précoces dans la MA, ce qui a pour conséquence une surexpression de l'APP et une augmentation du clivage avec la bêta sécrétase dans les endosomes entraînant un cercle vicieux de clivage APP et de production amyloïde (90, 464). Dans notre dernière étude, nous démontrons l'implication de la protéine rab1a dans la sécrétion de la protéine tau, par l'induction de la fragmentation de l'appareil de Golgi. La famille rab est donc une cible clef pour la modulation des voies impliquées dans la pathologie de la MA.

Pour conclure , l'implication de la fragmentation du Golgi dans la sécrétion directe de la protéine tau est une observation nouvelle et prometteuse, qui permet d'envisager une nouvelle stratégie, afin de ralentir la propagation de la pathologie de tau.

Bibliographie

1. Ferri CP, et al. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet Lond Engl* 366(9503):2112–2117.
2. Reitz C, Brayne C, Mayeux R (2011) Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 7(3):137–152.
3. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3(3):186–191.
4. McKhann GM, 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 J Alzheimers Assoc* 7(3):263–269.
5. Scheltens P, et al. Alzheimer's disease. *The Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(15)01124-1.
6. Campion D, et al. (1999) Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65(3):664–670.
7. Bertram L, Tanzi RE (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 115(6):1449–1457.
8. Hutton M, et al. (1996) Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* 7(3):801–805.
9. Alzheimer's Disease Collaborative Group (1995) The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet* 11(2):219–222.
10. Cruts M, Van Broeckhoven C (1998) Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat* 11(3):183–190.
11. Levy-Lahad E, et al. (1995) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269(5226):970–973.
12. Rogaev EI, 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(6543):775–778.

13. Goate A, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349(6311):704–706.
14. Chartier-Harlin MC, et al. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353(6347):844–846.
15. Verlinsky Y, et al. (2002) Preimplantation diagnosis for early-onset Alzheimer disease caused by V717L mutation. *JAMA* 287(8):1018–1021.
16. Murrell JR, Hake AM, Quaid KA, Farlow MR, Ghetti B (2000) Early-onset Alzheimer disease caused by a new mutation (V717L) in the amyloid precursor protein gene. *Arch Neurol* 57(6):885–887.
17. Bagyinszky E, Youn YC, An S, Kim S (2014) The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*:535.
18. Ertekin-Taner N (2007) Genetics of Alzheimer's Disease: A Centennial Review. *Neurol Clin* 25(3):611–667.
19. Sherrington R, et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375(6534):754–760.
20. Farrer LA, et al. (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278(16):1349–1356.
21. Myers RH, et al. (1996) Apolipoprotein E epsilon4 association with dementia in a population-based study: The Framingham study. *Neurology* 46(3):673–677.
22. Bickebölller H, et al. (1997) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *Am J Hum Genet* 60(2):439–446.
23. Slooter AJ, et al. (1998) Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: the Rotterdam Study. *Arch Neurol* 55(7):964–968.
24. Tang MX, et al. (1998) The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics. *JAMA* 279(10):751–755.
25. Breitner JC, et al. (1999) APOE-epsilon4 count predicts age when prevalence of AD increases, then declines: the Cache County Study. *Neurology* 53(2):321–331.
26. Graff-Radford NR, et al. (2002) Association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease in African American subjects. *Arch Neurol* 59(4):594–600.
27. Anand R, Gill KD, Mahdi AA (2014) Therapeutics of Alzheimer's disease: Past,

present and future. *Neuropharmacology* 76 Pt A:27–50.

28. Godyń J, Jończyk J, Panek D, Malawska B (2016) Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacol Rep PR* 68(1):127–138.
29. Birks J (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD005593.
30. Ames D, et al. (2008) For debate: is the evidence for the efficacy of cholinesterase inhibitors in the symptomatic treatment of Alzheimer's disease convincing or not? *Int Psychogeriatr IPA* 20(2):259–292.
31. McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N (2006) Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD003154.
32. Farrimond LE, Roberts E, McShane R (2012) Memantine and cholinesterase inhibitor combination therapy for Alzheimer's disease: a systematic review. *BMJ Open* 2(3). doi:10.1136/bmjopen-2012-000917.
33. Tan C-C, et al. (2014) Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis JAD* 41(2):615–631.
34. Perera G, Khondoker M, Broadbent M, Breen G, Stewart R (2014) Factors Associated with Response to Acetylcholinesterase Inhibition in Dementia: A Cohort Study from a Secondary Mental Health Care Case Register in London. *PLOS ONE* 9(11):e109484.
35. Karran E, Hardy J (2014) Antiamyloid therapy for Alzheimer's disease--are we on the right road? *N Engl J Med* 370(4):377–378.
36. Schröder J, Pantel J (2016) Neuroimaging of hippocampal atrophy in early recognition of Alzheimer's disease - a critical appraisal after two decades of research. *Psychiatry Res* 247:71–78.
37. Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122(3):1131–1135.
38. Grundke-Iqbal I, et al. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261(13):6084–6089.
39. Grundke-Iqbal I, et al. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(13):4913–

4917.

40. Evin G, Weidemann A (2002) Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 23(7):1285–1297.
41. Nunan J, Small DH (2002) Proteolytic processing of the amyloid-beta protein precursor of Alzheimer's disease. *Essays Biochem* 38:37–49.
42. Ling Y, Morgan K, Kalsheker N (2003) Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 35(11):1505–1535.
43. Buxbaum JD, et al. (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273(43):27765–27767.
44. Allinson TMJ, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74(3):342–352.
45. Sinha S, et al. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402(6761):537–540.
46. Vassar R, et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286(5440):735–741.
47. Yan R, et al. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402(6761):533–537.
48. Caughey B, Lansbury PT (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26:267–298.
49. Mattson MP, et al. (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 12(2):376–389.
50. Miranda S, et al. (2000) The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 62(6):633–648.
51. Morgan C, Colombres M, Nuñez MT, Inestrosa NC (2004) Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 74(6):323–349.
52. Chapman PF, et al. (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2(3):271–276.

53. Hsia AY, et al. (1999) Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6):3228–3233.
54. Walsh DM, et al. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416(6880):535–539.
55. Kamenetz F, et al. (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37(6):925–937.
56. Hsieh H, et al. (2006) AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52(5):831–843.
57. Shankar GM, et al. (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27(11):2866–2875.
58. Palop JJ, Mucke L (2010) Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 13(7):812–818.
59. Dumery L, et al. (2001) beta-Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Pathol Biol (Paris)* 49(1):72–85.
60. Giordano CR, Terlecky LJ, Bollig-Fischer A, Walton PA, Terlecky SR (2014) Amyloid-beta neuroprotection mediated by a targeted antioxidant. *Sci Rep* 4:4983.
61. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297(5580):353–356.
62. Musiek ES, Holtzman DM (2015) Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen.” *Nat Neurosci* 18(6):800–806.
63. Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. doi:10.15252/emmm.201606210.
64. De Strooper B, Chávez Gutiérrez L (2015) Learning by failing: ideas and concepts to tackle γ -secretases in Alzheimer's disease and beyond. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55:419–437.
65. Karran E, Hardy J (2014) A critique of the drug discovery and phase 3 clinical programs targeting the amyloid hypothesis for Alzheimer disease. *Ann Neurol* 76(2):185–205.
66. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 82(4):239–259.
67. Grundke-Iqbal I, Johnson AB, Wisniewski HM, Terry RD, Iqbal K (1979) Evidence

that Alzheimer neurofibrillary tangles originate from neurotubules. *Lancet Lond Engl* 1(8116):578–580.

68. Iqbal K, et al. (1986) Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet Lond Engl* 2(8504):421–426.

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

70. Li W, Li J, Bao J (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci CMLS* 69(7):1125–1136.

71. Cuervo AM, Wong E (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 24(1):92–104.

72. Yang Z, Klionsky DJ (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12(9):814–822.

73. Fimia GM, et al. (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447(7148):1121–1125.

74. Komatsu M, et al. (2007) Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(36):14489–14494.

75. Wang QJ, et al. (2006) Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26(31):8057–8068.

76. Lee S, Sato Y, Nixon RA (2011) Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31(21):7817–7830.

77. Maday S, Wallace KE, Holzbaur ELF (2012) Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol* 196(4):407–417.

78. Harris H, Rubinsztein DC (2012) Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 8(2):108–117.

79. Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 19(8):983–997.

80. Hara T, et al. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441(7095):885–889.

81. Komatsu M, et al. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes

neurodegeneration in mice. *Nature* 441(7095):880–884.

82. Ashrafi G, Schlehe JS, LaVoie MJ, Schwarz TL (2014) Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *J Cell Biol* 206(5):655–670.

83. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V (2014) Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell* 53(2):167–178.

84. Lipinski MM, et al. (2010) Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32):14164–14169.

85. Nixon RA, et al. (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(2):113–122.

86. Terry RD, Gonatas NK, Weiss M (1964) The ultrastructure of the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Trans Am Neurol Assoc* 89:12.

87. Boland B, et al. (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 28(27):6926–6937.

88. Nixon RA, Yang D-S (2011) Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol Dis* 43(1):38–45.

89. Cataldo AM, et al. (1995) Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* 14(3):671–680.

90. Cataldo AM, et al. (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol* 157(1):277–286.

91. Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ (1992) Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357(6378):500–503.

92. Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269(26):17386–17389.

93. Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and

function. *J Biol Chem* 283(44):29615–29619.

94. Tam JHK, Seah C, Pasternak SH (2014) The Amyloid Precursor Protein is rapidly transported from the Golgi apparatus to the lysosome and where it is processed into beta-amyloid. *Mol Brain* 7:54.

95. Cataldo A, et al. (2001) Endocytic disturbances distinguish among subtypes of Alzheimer's disease and related disorders. *Ann Neurol* 50(5):661–665.

96. Ginsberg SD, et al. (2010) Microarray analysis of hippocampal CA1 neurons implicates early endosomal dysfunction during Alzheimer's disease progression. *Biol Psychiatry* 68(10):885–893.

97. Ginsberg SD, et al. (2010) Regional selectivity of rab5 and rab7 protein upregulation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 22(2):631–639.

98. Cataldo AM, Thayer CY, Bird ED, Wheelock TR, Nixon RA (1990) Lysosomal proteinase antigens are prominently localized within senile plaques of Alzheimer's disease: evidence for a neuronal origin. *Brain Res* 513(2):181–192.

99. Cataldo AM, Nixon RA (1990) Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(10):3861–3865.

100. Cataldo AM, Barnett JL, Mann DM, Nixon RA (1996) Colocalization of lysosomal hydrolase and beta-amyloid in diffuse plaques of the cerebellum and striatum in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(6):704–715.

101. Schwagerl AL, et al. (1995) Elevated levels of the endosomal-lysosomal proteinase cathepsin D in cerebrospinal fluid in Alzheimer disease. *J Neurochem* 64(1):443–446.

102. Tooze SA, Abada A, Elazar Z (2014) Endocytosis and autophagy: exploitation or cooperation? *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(5):a018358.

103. Trounce I, Byrne E, Marzuki S (1989) Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet Lond Engl* 1(8639):637–639.

104. Bender A, et al. (2006) High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 38(5):515–517.

105. Ross JM, et al. (2013) Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nature* 501(7467):412–415.

106. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW (2010) Mitochondrial DNA

- mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1797(2):113–128.
107. Taylor RW, Turnbull DM (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6(5):389–402.
108. Mancuso M, et al. (2007) Lack of association between mtDNA haplogroups and Alzheimer's disease in Tuscany. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol* 28(3):142–147.
109. Lakatos A, et al. (2010) Association between mitochondrial DNA variations and Alzheimer's disease in the ADNI cohort. *Neurobiol Aging* 31(8):1355–1363.
110. Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 58(4):495–505.
111. de Leon MJ, et al. (1983) Positron emission tomographic studies of aging and Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 4(3):568–571.
112. Small GW, et al. (2000) Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11):6037–6042.
113. Parker WD, Parks J, Filley CM, Kleinschmidt-DeMasters BK (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 44(6):1090–1096.
114. Parker WD, Filley CM, Parks JK (1990) Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40(8):1302–1303.
115. Cottrell DA, Blakely EL, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM (2001) Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD. *Neurology* 57(2):260–264.
116. Kish SJ, et al. (1992) Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 59(2):776–779.
117. Lustbader JW, et al. (2004) ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304(5669):448–452.
118. Friedland-Leuner K, Stockburger C, Denzer I, Eckert GP, Müller WE (2014) Mitochondrial dysfunction: cause and consequence of Alzheimer's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 127:183–210.
119. Quintanilla RA, Matthews-Roberson TA, Dolan PJ, Johnson GVW (2009) Caspase-cleaved tau expression induces mitochondrial dysfunction in immortalized cortical neurons: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 284(28):18754–18766.
120. DuBoff B, Feany M, Götz J (2013) Why size matters - balancing mitochondrial

dynamics in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 36(6):325–335.

121. David DC, et al. (2005) Proteomic and Functional Analyses Reveal a Mitochondrial Dysfunction in P301L Tau Transgenic Mice. *J Biol Chem* 280(25):23802–23814.

122. Eckert A, Nisbet R, Grimm A, Götz J (2014) March separate, strike together--role of phosphorylated TAU in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842(8):1258–1266.

123. Reddy PH (2011) Abnormal Tau, Mitochondrial Dysfunction, Impaired Axonal Transport of Mitochondria, and Synaptic Deprivation in Alzheimer's Disease. *Brain Res* 1415:136–148.

124. Schulz KL, et al. (2012) A New Link to Mitochondrial Impairment in Tauopathies. *Mol Neurobiol* 46(1):205–216.

125. Rhein V, et al. (2009) Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(47):20057–20062.

126. Machamer CE (2003) Golgi disassembly in apoptosis: cause or effect? *Trends Cell Biol* 13(6):279–281.

127. Mellman I, Simons K (1992) The Golgi complex: in vitro veritas? *Cell* 68(5):829–840.

128. Polishchuk RS, Mironov AA (2004) Structural aspects of Golgi function. *Cell Mol Life Sci CMLS* 61(2):146–158.

129. Rambourg A, Clermont Y (1990) Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur J Cell Biol* 51(2):189–200.

130. Hu Z, Zeng L, Huang Z, Zhang J, Li T (2007) The study of Golgi apparatus in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 32(8):1265–1277.

131. Seemann J, Jokitalo E, Pypaert M, Warren G (2000) Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* 407(6807):1022–1026.

132. Pfeffer SR (1992) GTP-binding proteins in intracellular transport. *Trends Cell Biol* 2(2):41–46.

133. Rothman JE, Warren G (1994) Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol CB* 4(3):220–233.

134. Swaab DF, Dubelaar EJG, Scherder EJA, van Someren EJW, Verwer RWH (2003) Therapeutic strategies for Alzheimer disease: focus on neuronal reactivation of metabolically

- impaired neurons. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 17 Suppl 4:S114–122.
135. Takahashi RH, Nam EE, Edgar M, Gouras GK (2002) Alzheimer beta-amyloid peptides: normal and abnormal localization. *Histol Histopathol* 17(1):239–246.
136. Gonatas NK, Stieber A, Gonatas JO (2006) Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J Neurol Sci* 246(1-2):21–30.
137. Joshi G, Chi Y, Huang Z, Wang Y (2014) A β -induced Golgi fragmentation in Alzheimer's disease enhances A β production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(13):E1230–1239.
138. Shiba T, et al. (2004) Insights into the phosphoregulation of beta-secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1. *Traffic Cph Den* 5(6):437–448.
139. Yan R, Han P, Miao H, Greengard P, Xu H (2001) The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta - amyloid precursor protein (APP) substrate. *J Biol Chem* 276(39):36788–36796.
140. Fluhner R, et al. (2002) A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *J Neurochem* 81(5):1011–1020.
141. Baulac S, et al. (2003) Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretase substrates. *Neurobiol Dis* 14(2):194–204.
142. Wrigley JDJ, et al. (2005) Functional overexpression of gamma-secretase reveals protease-independent trafficking functions and a critical role of lipids for protease activity. *J Biol Chem* 280(13):12523–12535.
143. Tomita T, et al. (2001) The first proline of PALP motif at the C terminus of presenilins is obligatory for stabilization, complex formation, and gamma-secretase activities of presenilins. *J Biol Chem* 276(35):33273–33281.
144. Siman R, Velji J (2003) Localization of presenilin-nicastrin complexes and gamma-secretase activity to the trans-Golgi network. *J Neurochem* 84(5):1143–1153.
145. Cupers P, et al. (2001) The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol* 154(4):731–740.
146. Xia W, et al. (2000) Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid beta-protein generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16):9299–9304.
147. Yang D-S, et al. (2002) Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its

- binding to presenilins. *J Biol Chem* 277(31):28135–28142.
148. Leem JY, et al. (2002) Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J Biol Chem* 277(21):19236–19240.
149. Gu Y, et al. (2003) APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes. *J Biol Chem* 278(9):7374–7380.
150. Niimura M, et al. (2005) Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem* 280(13):12967–12975.
151. Wang H, et al. (2004) Presenilins and gamma-secretase inhibitors affect intracellular trafficking and cell surface localization of the gamma-secretase complex components. *J Biol Chem* 279(39):40560–40566.
152. Joshi G, Bekier ME, Wang Y (2015) Golgi fragmentation in Alzheimer’s disease. *Front Neurosci* 9:340.
153. Rivero S, Cardenas J, Bornens M, Rios RM (2009) Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J* 28(8):1016–1028.
154. Farah CA, et al. (2006) Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* 63(11):710–724.
155. Liazoghli D, Perreault S, Micheva KD, Desjardins M, Leclerc N (2005) Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons. *Am J Pathol* 166(5):1499–1514.
156. Jiang Q, et al. (2014) Golgin-84-associated Golgi fragmentation triggers tau hyperphosphorylation by activation of cyclin-dependent kinase-5 and extracellular signal-regulated kinase. *Neurobiol Aging* 35(6):1352–1363.
157. Liu S, Storrie B (2015) How Rab proteins determine Golgi structure. *Int Rev Cell Mol Biol* 315:1–22.
158. Thayer DA, Jan YN, Jan LY (2013) Increased neuronal activity fragments the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(4):1482–1487.
159. Liu S, Storrie B (2012) Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cell Mol Life Sci CMLS* 69(24):4093–4106.
160. Haas AK, et al. (2007) Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are

key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *J Cell Sci* 120(Pt 17):2997–3010.

161. Bard F, et al. (2006) Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization. *Nature* 439(7076):604–607.

162. Wang Y, Seemann J, Pypaert M, Shorter J, Warren G (2003) A direct role for GRASP65 as a mitotically regulated Golgi stacking factor. *EMBO J* 22(13):3279–3290.

163. Xiang Y, Wang Y (2010) GRASP55 and GRASP65 play complementary and essential roles in Golgi cisternal stacking. *J Cell Biol* 188(2):237–251.

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

165. Lee MS, et al. (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405(6784):360–364.

166. Salehi A, Swaab DF (1999) Diminished neuronal metabolic activity in Alzheimer's disease. Review article. *J Neural Transm Vienna Austria 1996* 106(9-10):955–986.

167. Dubelaar EJG, et al. (2004) ApoE ε4 Genotype Is Accompanied by Lower Metabolic Activity in Nucleus Basalis of Meynert Neurons in Alzheimer Patients and Controls as Indicated by the Size of the Golgi Apparatus. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(2):159–169.

168. Busche MA, et al. (2008) Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321(5896):1686–1689.

169. Johnson KA, Fox NC, Sperling RA, Klunk WE (2012) Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(4):a006213.

170. Celone KA, et al. (2006) Alterations in memory networks in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an independent component analysis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26(40):10222–10231.

171. Dickerson BC, et al. (2005) Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD. *Neurology* 65(3):404–411.

172. Hämäläinen A, et al. (2007) Increased fMRI responses during encoding in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 28(12):1889–1903.

173. Kim M-J, et al. (2012) Increased basal forebrain metabolism in mild cognitive

impairment: an evidence for brain reserve in incipient dementia. *J Alzheimers Dis JAD* 32(4):927–938.

174. Kircher TT, et al. (2007) Hippocampal activation in patients with mild cognitive impairment is necessary for successful memory encoding. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78(8):812–818.

175. Pihlajamäki M, Jauhiainen AM, Soininen H (2009) Structural and functional MRI in mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res* 6(2):179–185.

176. Putcha D, et al. (2011) Hippocampal hyperactivation associated with cortical thinning in Alzheimer's disease signature regions in non-demented elderly adults. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31(48):17680–17688.

177. Sturchler-Pierrat C, et al. (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24):13287–13292.

178. Grienberger C, et al. (2012) Staged decline of neuronal function in vivo in an animal model of Alzheimer's disease. *Nat Commun* 3:774.

179. Sanchez PE, et al. (2012) Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(42):E2895–2903.

180. Verret L, et al. (2012) Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 149(3):708–721.

181. Busche MA, et al. (2012) Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(22):8740–8745.

182. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (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(3):271–280.

183. Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry (Mosc)* 31(43):10626–10633.

184. Couchie D, et al. (1992) Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10):4378–4381.

185. Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) Tau proteins of Alzheimer

- paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8(1):159–168.
186. Sawa A, Oyama F, Matsushita M, Ihara Y (1994) Molecular diversity at the carboxyl terminus of human and rat tau. *Brain Res Mol Brain Res* 27(1):111–117.
187. Nelson PT, Stefansson K, Gulcher J, Saper CB (1996) Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 67(4):1622–1632.
188. Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33(1):95–130.
189. Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS (1995) Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res* 23(17):3585–3593.
190. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3(4):519–526.
191. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 8(2):393–399.
192. Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2(4):1389–1397.
193. Sergeant N, Delacourte A, Buée L (2005) Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739(2-3):179–197.
194. Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9(4):1381–1388.
195. Alonso AD, et al. (2001) Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. *J Biol Chem* 276(41):37967–37973.
196. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101(4):1371–1378.

197. Brion JP, Guillemot J, Couchie D, Flament-Durand J, Nunez J (1988) Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neuroscience* 25(1):139–146.
198. Ludin B, Matus A (1993) The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and dendritic plasticity. *Hippocampus* 3 Spec No:61–71.
199. Mandell JW, Banker GA (1996) Microtubule-associated proteins, phosphorylation gradients, and the establishment of neuronal polarity. *Perspect Dev Neurobiol* 4(2-3):125–135.
200. Brandt R, Lee G (1993) The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. *J Neurochem* 61(3):997–1005.
201. Brandt R, Lee G (1993) Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J Biol Chem* 268(5):3414–3419.
202. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116(2):227–247.
203. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116(2):207–225.
204. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(5):1858–1862.
205. 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(13):4225–4230.
206. Butner KA, Kirschner MW (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol* 115(3):717–730.
207. Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994) Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry (Mosc)* 33(32):9511–9522.
208. Goode BL, Feinstein SC (1994) Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124(5):769–782.
209. Lindwall G, Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to

- promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259(8):5301–5305.
210. Johnson GVW, Stoothoff WH (2004) Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* 117(24):5721–5729.
211. Cho J-H, Johnson GVW (2004) Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J Neurochem* 88(2):349–358.
212. D'Souza I, Schellenberg GD (2000) Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 275(23):17700–17709.
213. Hernández F, et al. (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279(5):3801–3806.
214. Shi J, et al. (2011) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the alternative splicing of tau exon 10: a mechanism involved in tau pathology of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286(16):14639–14648.
215. Takano T, Xu C, Funahashi Y, Namba T, Kaibuchi K (2015) Neuronal polarization. *Development* 142(12):2088–2093.
216. Arimura N, Kaibuchi K (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8(3):194–205.
217. Barnes AP, Polleux F (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32:347–381.
218. Harada A, et al. (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369(6480):488–491.
219. Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343(6257):461–463.
220. Brandt R, Léger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131(5):1327–1340.
221. Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107(4):1449–1459.
222. Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360(6405):674–677.

223. Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21):3167–3177.
224. Brady RM, Zinkowski RP, Binder LI (1995) Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging* 16(3):479–486.
225. Wei Y, et al. (2008) Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PloS One* 3(7):e2600.
226. Hua Q, et al. (2003) Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci CMLS* 60(2):413–421.
227. Sultan A, et al. (2011) Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* 286(6):4566–4575.
228. Violet M, et al. (2015) Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo. *Neurobiol Dis* 82:540–551.
229. 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.
230. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84(2):361–384.
231. Mandelkow E, Song YH, Schweers O, Marx A, Mandelkow EM (1995) On the structure of microtubules, tau, and paired helical filaments. *Neurobiol Aging* 16(3):347–354.
232. Ishiguro K, et al. (1993) Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* 325(3):167–172.
233. Noble W, et al. (2003) Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38(4):555–565.
234. Cruz JC, Tsai L-H (2004) Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 10(9):452–458.
235. Morishima-Kawashima M, et al. (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270(2):823–829.
236. Jicha GA, O'Donnell A, Weaver C, Angeletti R, Davies P (1999) Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 72(1):214–224.
237. Litersky JM, Johnson GV (1992) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* 267(3):1563–1568.

238. Greenwood JA, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV (1994) Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem* 269(6):4373–4380.
239. Lee G, et al. (2004) Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24(9):2304–2312.
240. Lee G (2005) Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1739(2-3):323–330.
241. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22(8):1942–1950.
242. Gong CX, et al. (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275(8):5535–5544.
243. Bennecib M, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS Lett* 485(1):87–93.
244. Qian W, et al. (2010) PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3beta. *J Alzheimers Dis JAD* 19(4):1221–1229.
245. Goedert M, Jakes R, Qi Z, Wang JH, Cohen P (1995) Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 65(6):2804–2807.
246. Kins S, et al. (2001) Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *J Biol Chem* 276(41):38193–38200.
247. Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Bloom GS, Mumby MC (1996) Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. *Neuron* 17(6):1201–1207.
248. Sontag E, et al. (1999) Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem* 274(36):25490–25498.

249. Gong C-X, et al. (2004) Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. *J Neurochem* 88(2):298–310.
250. Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Rossie S, Gong C-X (2005) Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 280(3):1790–1796.
251. Watanabe A, et al. (1993) In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J Biol Chem* 268(34):25712–25717.
252. Kanemaru K, Takio K, Miura R, Titani K, Ihara Y (1992) Fetal-Type Phosphorylation of the τ in Paired Helical Filaments. *J Neurochem* 58(5):1667–1675.
253. Biernat J, Mandelkow EM (1999) The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell* 10(3):727–740.
254. Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J (1985) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol* 17(1):89–96.
255. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121–1159.
256. Braak E, Braak H, Mandelkow EM (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol (Berl)* 87(6):554–567.
257. Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2008) Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med* 12(1):38–55.
258. Cairns NJ, et al. (2007) Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 114(1):5–22.
259. Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C (2007) Frontotemporal lobar degeneration: current concepts in the light of recent advances. *Brain Pathol Zurich Switz* 17(1):104–114.
260. Hutton M, et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393(6686):702–705.
261. Poorkaj P, et al. (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 43(6):815–825.
262. Poorkaj P, et al. (2001) Frequency of tau gene mutations in familial and sporadic cases of non-Alzheimer dementia. *Arch Neurol* 58(3):383–387.

263. Rademakers R, Cruts M, van Broeckhoven C (2004) The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum Mutat* 24(4):277–295.
264. Galimberti D, Scarpini E (2012) Genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Front Neurol* 3:52.
265. Goedert M, Spillantini MG (2000) Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502(1):110–121.
266. Goedert M, Ghetti B, Spillantini MG (2012) Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(2):a006254.
267. Gerrish A, et al. (2012) The role of variation at A β PP, PSEN1, PSEN2, and MAPT in late onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 28(2):377–387.
268. Schraen-Maschke S, Dhaenens C-M, Delacourte A, Sablonnière B (2004) Microtubule-associated protein tau gene: a risk factor in human neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis* 15(3):449–460.
269. Hasegawa M, et al. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 267(24):17047–17054.
270. Hanger DP, Betts JC, Loviny TL, Blackstock WP, Anderton BH (1998) New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J Neurochem* 71(6):2465–2476.
271. Iqbal K, Liu F, Gong C-X (2016) Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol* 12(1):15–27.
272. Porzig R, Singer D, Hoffmann R (2007) Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. *Biochem Biophys Res Commun* 358(2):644–649.
273. Mailliot C, Bussi ere T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A, Bu e L (1998) Alzheimer-specific epitope of AT100 in transfected cell lines with tau: toward an efficient cell model of tau abnormal phosphorylation. *Neurosci Lett* 255(1):13–16.
274. Bancher C, et al. (1989) Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 477(1-2):90–99.
275. Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 61(3):921–927.

276. Gong CX, et al. (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 65(2):732–738.
277. Pei JJ, Sersen E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1994) Expression of protein phosphatases (PP-1, PP-2A, PP-2B and PTP-1B) and protein kinases (MAP kinase and P34cdc2) in the hippocampus of patients with Alzheimer disease and normal aged individuals. *Brain Res* 655(1-2):70–76.
278. Tanimukai H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2005) Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 166(6):1761–1771.
279. Tsujio I, et al. (2005) Inhibitors of protein phosphatase-2A from human brain structures, immunocytological localization and activities towards dephosphorylation of the Alzheimer type hyperphosphorylated tau. *FEBS Lett* 579(2):363–372.
280. Chohan MO, Khatoon S, Iqbal I-G, Iqbal K (2006) Involvement of I2PP2A in the abnormal hyperphosphorylation of tau and its reversal by Memantine. *FEBS Lett* 580(16):3973–3979.
281. Zheng-Fischhöfer Q, et al. (1998) Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem FEBS* 252(3):542–552.
282. Wang J-Z, Xia Y-Y, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2013) Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimers Dis JAD* 33 Suppl 1:S123–139.
283. del Ser T, et al. (2013) Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. *J Alzheimers Dis JAD* 33(1):205–215.
284. Mandelkow E-M, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E (2003) Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* 24(8):1079–1085.
285. Planel E, et al. (2008) Anesthesia-induced hyperphosphorylation detaches 3-repeat tau from microtubules without affecting their stability in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 28(48):12798–12807.
286. Bertrand J, Plouffe V, Sénéchal P, Leclerc N (2010) The pattern of human tau phosphorylation is the result of priming and feedback events in primary hippocampal neurons.

Neuroscience 168(2):323–334.

287. Ishihara T, et al. (1999) Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24(3):751–762.
288. Spittaels K, et al. (1999) Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155(6):2153–2165.
289. Duff K, et al. (2000) Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* 7(2):87–98.
290. Lewis J, et al. (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25(4):402–405.
291. Probst A, et al. (2000) Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 99(5):469–481.
292. Tatebayashi Y, et al. (2002) Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21):13896–13901.
293. Santacruz K, et al. (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309(5733):476–481.
294. Alonso AD, et al. (2010) Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *J Biol Chem* 285(40):30851–30860.
295. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42(3 Pt 1):631–639.
296. Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P (1997) Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res* 48(2):128–132.
297. Jicha GA, et al. (1997) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 69(5):2087–2095.
298. Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J (1996) The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 271(51):32789–32795.

299. Burns A, Tomlinson BE, Mann DM (1997) Observations on the brains of demented old people. B.E. Tomlinson, G. Blessed and M. Roth, *Journal of the Neurological Sciences* (1970) 11, 205-242 and Observations on the brains of non-demented old people. B.E. Tomlinson, G. Blessed and M. Roth, *Journal of Neurological Sciences* (1968) 7, 331-356. *Int J Geriatr Psychiatry* 12(8):785–790.
300. Alafuzoff I, Iqbal K, Friden H, Adolfsson R, Winblad B (1987) Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis. *Acta Neuropathol (Berl)* 74(3):209–225.
301. Bierer LM, et al. (1995) Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52(1):81–88.
302. Gendron TF, Petrucelli L (2009) The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4:13.
303. Wittmann CW, et al. (2001) Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293(5530):711–714.
304. Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Fulga TA, Felch DL, Feany MB (2007) Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Mol Biol Cell* 18(12):5060–5068.
305. Spires TL, et al. (2006) Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol* 168(5):1598–1607.
306. Berger Z, et al. (2007) Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27(14):3650–3662.
307. Lasagna-Reeves CA, et al. (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 26(5):1946–1959.
308. Gamblin TC, et al. (2003) Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(17):10032–10037.
309. Rissman RA, et al. (2004) Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest* 114(1):121–130.
310. Lasagna-Reeves CA, et al. (2011) Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener* 6:39.
311. Maeda S, et al. (2006) Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain

- aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res* 54(3):197–201.
312. Lasagna-Reeves CA, et al. (2012) Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci Rep* 2:700.
313. Mandelkow E-M, Mandelkow E (2012) Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(7):a006247.
314. Usenovic M, et al. (2015) Internalized Tau Oligomers Cause Neurodegeneration by Inducing Accumulation of Pathogenic Tau in Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 35(42):14234–14250.
315. Köpke E, et al. (1993) Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 268(32):24374–24384.
316. Baddeley TC, et al. (2015) Complex disposition of methylthioninium redox forms determines efficacy in tau aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 352(1):110–118.
317. Wischik CM, et al. (2015) Tau aggregation inhibitor therapy: an exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 44(2):705–720.
318. Lace G, et al. (2009) Hippocampal tau pathology is related to neuroanatomical connections: an ageing population-based study. *Brain J Neurol* 132(Pt 5):1324–1334.
319. Brundin P, Melki R, Kopito R (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4):301–307.
320. Goedert M (2015) NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science* 349(6248):1255555.
321. Mohamed N-V, Herrou T, Plouffe V, Piperno N, Leclerc N (2013) Spreading of tau pathology in Alzheimer's disease by cell-to-cell transmission. *Eur J Neurosci* 37(12):1939–1948.
322. Clavaguera F, Hench J, Goedert M, Tolnay M (2015) Invited review: Prion-like transmission and spreading of tau pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41(1):47–58.
323. Frost B, Diamond MI (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 11(3):155–159.
324. Walker LC, Diamond MI, Duff KE, Hyman BT (2013) Mechanisms of protein seeding

in neurodegenerative diseases. *JAMA Neurol* 70(3):304–310.

325. Arai H, et al. (1995) Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 38(4):649–652.

326. Kahle PJ, et al. (2000) Combined assessment of tau and neuronal thread protein in Alzheimer's disease CSF. *Neurology* 54(7):1498–1504.

327. Andreasen N, et al. (2001) Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol* 58(3):373–379.

328. Hampel H, et al. (2010) Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 45(1):30–40.

329. Mattsson N, et al. (2009) CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 302(4):385–393.

330. Saman S, et al. (2012) Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287(6):3842–3849.

331. Borroni B, et al. (2009) Pattern of Tau forms in CSF is altered in progressive supranuclear palsy. *Neurobiol Aging* 30(1):34–40.

332. Johnson GV, et al. (1997) The tau protein in human cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease consists of proteolytically derived fragments. *J Neurochem* 68(1):430–433.

333. Meredith Jr. JE, et al. (2013) Characterization of Novel CSF Tau and ptau Biomarkers for Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 8(10). doi:10.1371/journal.pone.0076523.

334. Luk C, et al. (2012) Development and assessment of sensitive immuno-PCR assays for the quantification of cerebrospinal fluid three- and four-repeat tau isoforms in tauopathies. *J Neurochem* 123(3):396–405.

335. Clavaguera F, et al. (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11(7):909–913.

336. Frost B, Jacks RL, Diamond MI (2009) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284(19):12845–12852.

337. Kim W, Lee S, Hall GF (2010) Secretion of human tau fragments resembling CSF-tau in Alzheimer's disease is modulated by the presence of the exon 2 insert. *FEBS Lett* 584(14):3085–3088.

338. Kim W, et al. (2010) Interneuronal transfer of human tau between Lamprey central

- neurons in situ. *J Alzheimers Dis JAD* 19(2):647–664.
339. Guo JL, Lee VM-Y (2011) Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J Biol Chem* 286(17):15317–15331.
340. 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 Off J Soc Neurosci* 31(37):13110–13117.
341. Chai X, Dage JL, Citron M (2012) Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol Dis* 48(3):356–366.
342. Karch CM, Jeng AT, Goate AM (2012) Extracellular Tau levels are influenced by variability in Tau that is associated with tauopathies. *J Biol Chem* 287(51):42751–42762.
343. Kfoury N, Holmes BB, Jiang H, Holtzman DM, Diamond MI (2012) Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J Biol Chem* 287(23):19440–19451.
344. Plouffe V, et al. (2012) Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PloS One* 7(5):e36873.
345. Simón D, García-García E, Royo F, Falcón-Pérez JM, Avila J (2012) Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett* 586(1):47–54.
346. Wu JW, et al. (2013) Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem* 288(3):1856–1870.
347. de Calignon A, et al. (2012) Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 73(4):685–697.
348. Liu L, et al. (2012) Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PloS One* 7(2):e31302.
349. Barten DM, et al. (2011) Tau transgenic mice as models for cerebrospinal fluid tau biomarkers. *J Alzheimers Dis JAD* 24 Suppl 2:127–141.
350. Díaz-Hernández M, et al. (2010) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J Biol Chem* 285(42):32539–32548.
351. Polydoro M, Acker CM, Duff K, Castillo PE, Davies P (2009) Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29(34):10741–10749.

352. Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12):5562–5566.
353. Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2(7):783–787.
354. Sanders DW, et al. (2014) Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 82(6):1271–1288.
355. Asai H, et al. (2015) Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 18(11):1584–1593.
356. Dujardin S, et al. (2014) Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol Commun* 2:14.
357. Takeda S, et al. (2015) Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nat Commun* 6:8490.
358. Holmes BB, Diamond MI (2014) Prion-like Properties of Tau Protein: The Importance of Extracellular Tau as a Therapeutic Target. *J Biol Chem* 289(29):19855–19861.
359. Holmes BB, et al. (2013) Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(33):E3138–3147.
360. Mirbaha H, Holmes BB, Sanders DW, Bieschke J, Diamond MI (2015) Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation. *J Biol Chem* 290(24):14893–14903.
361. Funk KE, Mirbaha H, Jiang H, Holtzman DM, Diamond MI (2015) Distinct Therapeutic Mechanisms of Tau Antibodies: Promoting Microglial Clearance Versus Blocking Neuronal Uptake. *J Biol Chem* 290(35):21652–21662.
362. Simón D, et al. (2012) Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener Dis* 10(1-4):73–75.
363. Lee MCS, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:87–123.
364. Nickel W, Rabouille C (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(2):148–155.

365. Perreault S, Bousquet O, Lauzon M, Paiement J, Leclerc N (2009) Increased association between rough endoplasmic reticulum membranes and mitochondria in transgenic mice that express P301L tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(5):503–514.
366. Yoo J-S, et al. (2002) Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem* 277(13):11401–11409.
367. Lee S, Kim W, Li Z, Hall GF (2012) Accumulation of vesicle-associated human tau in distal dendrites drives degeneration and tau secretion in an in situ cellular tauopathy model. *Int J Alzheimers Dis* 2012:172837.
368. Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V (2010) Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol* 188(4):527–536.
369. Andrei C, et al. (1999) The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 10(5):1463–1475.
370. Wang X, et al. (2004) COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol* 167(1):65–74.
371. Fatal N, Suntio T, Makarow M (2002) Selective protein exit from yeast endoplasmic reticulum in absence of functional COPII coat component Sec13p. *Mol Biol Cell* 13(12):4130–4140.
372. Ponnambalam S (2003) Protein secretion and the Golgi apparatus. *Mol Membr Biol* 20(2):97–98.
373. Ponnambalam S, Baldwin SA (2003) Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol* 20(2):129–139.
374. Dujardin S, et al. (2014) Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PloS One* 9(6):e100760.
375. Mohamed N-V, Plouffe V, Rémillard-Labrosse G, Planel E, Leclerc N (2014) Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons. *Sci Rep* 4:5715.
376. Kanmert D, et al. (2015) C-Terminally Truncated Forms of Tau, But Not Full-Length Tau or Its C-Terminal Fragments, Are Released from Neurons Independently of Cell Death. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 35(30):10851–10865.
377. Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Rubio A, Miras-Portugal MT, Avila J (2008)

Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 37(4):673–681.

378. Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Cuadros R, Hernández F, Avila J (2006) Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett* 580(20):4842–4850.

379. de Calignon A, et al. (2010) Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464(7292):1201–1204.

380. Sokolow S, et al. (2015) Pre-synaptic C-terminal truncated tau is released from cortical synapses in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 133(3):368–379.

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

382. Sergeant N, et al. (2008) Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 5(2):207–224.

383. Beharry C, et al. (2014) Tau-induced neurodegeneration: mechanisms and targets. *Neurosci Bull* 30(2):346–358.

384. Pompl PN, et al. (2003) Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60(3):369–376.

385. Louneva N, et al. (2008) Caspase-3 Is Enriched in Postsynaptic Densities and Increased in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* 173(5):1488–1495.

386. Hyman BT, Yuan J (2012) Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nat Rev Neurosci* 13(6):395–406.

387. García-Sierra F, Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G (2008) Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 14(4):401–409.

388. Haltiwanger RS, et al. (1997) O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 231(2):237–242.

389. Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW (1997) Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272(14):9308–9315.

390. Lefebvre T, Caillet-Boudin M-L, Buée L, Delacourte A, Michalski J-C (2003) O-GlcNAc glycosylation and neurological disorders. *Adv Exp Med Biol* 535:189–202.

391. Lefebvre T, et al. (2003) Evidence of a balance between phosphorylation and O-

GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* 1619(2):167–176.

392. Robertson LA, Moya KL, Breen KC (2004) The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 6(5):489–495.

393. Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong C-X (2002) Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3beta. *FEBS Lett* 530(1-3):209–214.

394. Pooler AM, et al. (2012) Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiol Aging* 33(2):431.e27–38.

395. Von Bartheld CS, Altick AL (2011) Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. *Prog Neurobiol* 93(3):313–340.

396. Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO (1998) Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem* 273(34):21883–21892.

397. Liu J, et al. (2009) Rab11a and HSP90 regulate recycling of extracellular alpha-synuclein. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29(5):1480–1485.

398. Hasegawa T, et al. (2011) The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of α -synuclein. *PLoS One* 6(12):e29460.

399. Lim F, et al. (2001) FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci* 18(6):702–714.

400. Tai H-C, et al. (2012) The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am J Pathol* 181(4):1426–1435.

401. Calafate S, et al. (2015) Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation. *Cell Rep* 11(8):1176–1183.

402. Verderio C (2013) Extracellular membrane microvesicles and nanotubes in the brain: understanding their nature, their function in cell-to-cell communication, their role in transcellular spreading of pathological agents and their therapeutic potential. *Front Physiol* 4:163.

403. Kalra H, et al. (2012) Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* 10(12):e1001450.

404. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73(10):1907–1920.
405. Raposo G, et al. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183(3):1161–1172.
406. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19(2):43–51.
407. Davizon P, Munday AD, López JA (2010) Tissue factor, lipid rafts, and microparticles. *Semin Thromb Hemost* 36(8):857–864.
408. Piccin A, Murphy WG, Smith OP (2007) Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 21(3):157–171.
409. Vingtdeux V, Sergeant N, Buée L (2012) Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer’s disease. *Front Physiol* 3:229.
410. Aguzzi A, Rajendran L (2009) The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 64(6):783–790.
411. Schneider A, Simons M (2013) Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell Tissue Res* 352(1):33–47.
412. Sharples RA, et al. (2008) Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 22(5):1469–1478.
413. Tamboli IY, et al. (2010) Statins promote the degradation of extracellular amyloid {beta}-peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *J Biol Chem* 285(48):37405–37414.
414. Yuyama K, et al. (2014) Decreased amyloid- β pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J Biol Chem* 289(35):24488–24498.
415. Dinkins MB, Dasgupta S, Wang G, Zhu G, Bieberich E (2014) Exosome reduction in vivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 35(8):1792–1800.
416. Rajendran L, et al. (2006) Alzheimer’s disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30):11172–11177.
417. An K, et al. (2013) Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of A β

assemblies in vivo. *Mol Brain* 6:47.

418. Joshi P, et al. (2014) Microglia convert aggregated amyloid- β into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. *Cell Death Differ* 21(4):582–593.

419. Colombo E, Borgiani B, Verderio C, Furlan R (2012) Microvesicles: novel biomarkers for neurological disorders. *Front Physiol* 3:63.

420. Bright J, et al. (2015) Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiol Aging* 36(2):693–709.

421. Pooler AM, Phillips EC, Lau DHW, Noble W, Hanger DP (2013) Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* 14(4):389–394.

422. Pooler AM, et al. (2015) Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 3. doi:10.1186/s40478-015-0199-x.

423. Guidato S, McLoughlin DM, Grierson AJ, Miller CC (1998) Cyclin D2 interacts with cdk-5 and modulates cellular cdk-5/p35 activity. *J Neurochem* 70(1):335–340.

424. Xiong Y, Zhang H, Beach D (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71(3):505–514.

425. Miyajima M, Nornes HO, Neuman T (1995) Cyclin E is expressed in neurons and forms complexes with cdk5. *Neuroreport* 6(8):1130–1132.

426. Lew J, et al. (1994) A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371(6496):423–426.

427. Tsai LH, Delalle I, Caviness VS, Chae T, Harlow E (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371(6496):419–423.

428. Humbert S, Dhavan R, Tsai L (2000) p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 113 (Pt 6):975–983.

429. Humbert S, Lanier LM, Tsai LH (2000) Synaptic localization of p39, a neuronal activator of cdk5. *Neuroreport* 11(10):2213–2216.

430. Ishiguro K, et al. (1994) Identification of the 23 kDa subunit of tau protein kinase II as a putative activator of cdk5 in bovine brain. *FEBS Lett* 342(2):203–208.

431. Nguyen MD, Larivière RC, Julien JP (2001) Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron* 30(1):135–147.

432. Pei JJ, et al. (1998) Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res* 797(2):267–277.

433. Nakamura S, Kawamoto Y, Nakano S, Akiguchi I, Kimura J (1998) Cyclin-dependent kinase 5 and mitogen-activated protein kinase in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(7):690–698.
434. Ahlijanian MK, et al. (2000) Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6):2910–2915.
435. Patrick GN, et al. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402(6762):615–622.
436. Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10):749–759.
437. Amin ND, Albers W, Pant HC (2002) Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activation requires interaction with three domains of p35. *J Neurosci Res* 67(3):354–362.
438. Quintanilla RA, Orellana DI, González-Billault C, Maccioni RB (2004) Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res* 295(1):245–257.
439. Zhou J, Wang H, Feng Y, Chen J (2010) Increased expression of cdk5/p25 in N2a cells leads to hyperphosphorylation and impaired axonal transport of neurofilament proteins. *Life Sci* 86(13-14):532–537.
440. Zheng Y-L, Li B-S, Amin ND, Albers W, Pant HC (2002) A peptide derived from cyclin-dependent kinase activator (p35) specifically inhibits Cdk5 activity and phosphorylation of tau protein in transfected cells. *Eur J Biochem FEBS* 269(18):4427–4434.
441. Kesavapany S, Zheng Y-L, Amin N, Pant HC (2007) Peptides derived from Cdk5 activator p35, specifically inhibit deregulated activity of Cdk5. *Biotechnol J* 2(8):978–987.
442. Zheng Y-L, et al. (2005) A Cdk5 inhibitory peptide reduces tau hyperphosphorylation and apoptosis in neurons. *EMBO J* 24(1):209–220.
443. Chauhan NB, Siegel GJ, Feinstein DL (2005) Propentofylline attenuates tau hyperphosphorylation in Alzheimer's Swedish mutant model Tg2576. *Neuropharmacology* 48(1):93–104.
444. Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15(3):112–119.
445. Arioka M, et al. (1993) Tau protein kinase II is involved in the regulation of the normal phosphorylation state of tau protein. *J Neurochem* 60(2):461–468.

446. Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH (1993) Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J Biol Chem* 268(31):23512–23518.
447. Lund ET, McKenna R, Evans DB, Sharma SK, Mathews WR (2001) Characterization of the in vitro phosphorylation of human tau by tau protein kinase II (cdk5/p20) using mass spectrometry. *J Neurochem* 76(4):1221–1232.
448. Landrieu I, et al. (2010) NMR spectroscopy of the neuronal tau protein: normal function and implication in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 38(4):1006–1011.
449. Prabakaran S, et al. (2011) Comparative analysis of Erk phosphorylation suggests a mixed strategy for measuring phospho-form distributions. *Mol Syst Biol* 7:482.
450. Wada Y, et al. (1998) Microtubule-stimulated phosphorylation of tau at Ser202 and Thr205 by cdk5 decreases its microtubule nucleation activity. *J Biochem (Tokyo)* 124(4):738–746.
451. Sakaue F, et al. (2005) Phosphorylation of FTDP-17 mutant tau by cyclin-dependent kinase 5 complexed with p35, p25, or p39. *J Biol Chem* 280(36):31522–31529.
452. Yotsumoto K, et al. (2009) Effect of Pin1 or microtubule binding on dephosphorylation of FTDP-17 mutant Tau. *J Biol Chem* 284(25):16840–16847.
453. Kimura T, et al. (2013) Isomerase Pin1 stimulates dephosphorylation of tau protein at cyclin-dependent kinase (Cdk5)-dependent Alzheimer phosphorylation sites. *J Biol Chem* 288(11):7968–7977.
454. Illenberger S, et al. (1998) The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* 9(6):1495–1512.
455. Yamaguchi H, et al. (1996) Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol (Berl)* 92(3):232–241.
456. Augustinack JC, Sanders JL, Tsai L-H, Hyman BT (2002) Colocalization and fluorescence resonance energy transfer between cdk5 and AT8 suggests a close association in pre-neurofibrillary tangles and neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(6):557–564.
457. Oláh Z, et al. (2015) Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease:

- wanted dead or alive. *J Alzheimers Dis JAD* 44(4):1303–1312.
458. Pereira-Leal JB, Seabra MC (2000) The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J Mol Biol* 301(4):1077–1087.
459. Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62(2):317–329.
460. Pfeffer S, Aivazian D (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11):886–896.
461. Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397(6720):621–625.
462. Li G (2011) Rab GTPases, membrane trafficking and diseases. *Curr Drug Targets* 12(8):1188–1193.
463. Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, Ono F, Negishi T (2009) Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction. *J Biol Chem* 284(45):31291–31302.
464. Jiang Y, et al. (2010) Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is Abeta-independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4):1630–1635.

