

Université de Montréal

**Relation entre la phosphorylation de Tau et la fragmentation de
l'appareil de Golgi**

par

Juliette Foucher

Département de Neurosciences

Faculté de Médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)

en Neurosciences

Décembre, 2016

© Juliette Foucher, 2016

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Relation entre la phosphorylation de Tau et la fragmentation de l'appareil de Golgi

Présenté par :

Juliette Foucher

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Karl Fernandes

Président-rapporteur

Dre Nicole Leclerc

Directrice de recherche

Dr Roger Lippé

Membre du jury

Résumé

Dans la maladie d'Alzheimer (MA), il y a deux lésions neuropathologiques majeures, les plaques séniles composées du peptide amyloïde-bêta et les enchevêtrements neurofibrillaires formés de la protéine Tau hyperphosphorylée et agrégée. L'une des caractéristiques cellulaires de la MA est la fragmentation de l'appareil de Golgi (AG). Cette fragmentation est observée tôt dans la MA, et peut être induite par le peptide amyloïde-bêta extracellulaire. Cependant, plusieurs études laissent croire que la protéine Tau hyperphosphorylée pourrait également contribuer à la fragmentation de l'AG. Nous avons donc examiné si la Tau hyperphosphorylée pouvait induire une fragmentation de l'AG lors de sa surexpression dans les cellules HeLa. Nos résultats montrent que la surexpression d'une forme hyperphosphorylée de Tau induit plus rapidement une fragmentation Golgienne qu'une forme non-phosphorylable de Tau. La protéine Tau peut être sécrétée dans l'espace extracellulaire, la tau hyperphosphorylée étant la forme de tau la plus sécrétée. Nous avons donc examiné la capacité de la protéine Tau extracellulaire à pouvoir induire une fragmentation Golgienne. La Tau hyperphosphorylée extracellulaire a été la seule forme de Tau à induire une fragmentation de l'AG. Nous nous sommes ensuite demandés si ce phénomène était dû à la plus importante phosphorylation de cette forme de Tau ou bien à sa plus grande quantité dans le milieu extracellulaire. Nos expériences de dilution du milieu ont permis de démontrer une relation dose-dépendante entre la quantité de Tau hyperphosphorylée extracellulaire et la fragmentation Golgienne. Ensuite nous avons tenté d'identifier le domaine de Tau impliqué dans cette fragmentation. Nos résultats ont révélé que la séquence de Tau inductrice de la fragmentation Golgienne se trouve dans sa partie C-terminale qui contient les séquences répétées impliquées dans sa liaison avec les microtubules (MTBD). Toutefois, nos résultats indiquent que l'effet de Tau sur l'AG ne fait pas intervenir de modification microtubulaire, ce qui nous laisse à croire que la Tau intracellulaire n'est pas responsable de la fragmentation Golgienne. Finalement, nous avons vérifié si l'AG demeurait fonctionnel suite à la surexpression de Tau en examinant le transport de la protéine VSVG. Nos expériences indiquent que la surexpression de Tau n'affecte pas le transport de VSVG. En conclusion, nous avons démontré que la Tau extracellulaire peut induire une fragmentation de l'AG.

Cependant, le lien entre ces deux évènements demeure inconnu. Sachant que la fragmentation de l'AG peut affecter le fonctionnement neuronal, la Tau extracellulaire pourrait devenir une cible thérapeutique pour la MA.

Mots-clés : Alzheimer, Tauopathie, Golgi, fragmentation, hyperphosphorylation, Tau extracellulaire

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized by two neuropathological lesions, senile plaques composed of Abeta peptide and neurofibrillary tangles formed by hyperphosphorylated and aggregated Tau protein. Interestingly, in AD, a fragmentation of Golgi apparatus is noted at early stages of the disease. It was recently shown that the extracellular pool of Abeta peptide can induce a fragmentation of the Golgi. However, several studies indicated that hyperphosphorylated Tau could also contribute to this fragmentation. We therefore examined whether hyperphosphorylated Tau could induce a fragmentation of the Golgi by overexpressing it in HeLa cells. Our results revealed that a Tau mutant mimicking hyperphosphorylation induced an earlier fragmentation of the Golgi than a non-phosphorylatable Tau mutant. We previously demonstrated that Tau can be secreted in the extracellular space, the mutant mimicking hyperphosphorylation being the most secreted. We then examined whether extracellular Tau was able to induce a fragmentation of the Golgi as noted for extracellular Abeta. Interestingly, the mutant mimicking Tau hyperphosphorylation was the sole form of Tau that could induce a Golgi fragmentation when it was present in the medium. We then determine whether the induction of the fragmentation by extracellular hyperphosphorylated Tau was linked to its phosphorylation state and/or to its high amount in the medium. Our results indicate that the Golgi fragmentation induced by hyperphosphorylated Tau was caused by its high levels in the medium. We also investigated which domain of Tau was involved in the induction of the Golgi fragmentation. Our results revealed that the sequence of Tau responsible the Golgi fragmentation is located in its C-terminal where the repeated sequences (MTBD) involved in its association with microtubules are found. However, no alteration of the microtubules was noted in the HeLa overexpressing Tau indicating that the microtubules would not be involved in Tau-induced Golgi fragmentation. This supports the fact that extracellular not intracellular Tau is responsible for the fragmentation of the Golgi. Finally, by examining the trafficking of the VSVG protein, we showed that the Golgi remained functional upon the overexpression of Tau in HeLa cells. In conclusions, our results demonstrated that extracellular tau is the main pool of Tau responsible for its induction of the Golgi fragmentation. The link between extracellular Tau and the

fragmentation of the Golgi remains to be elucidated. Knowing that the Golgi fragmentation could become detrimental to neurons, extracellular Tau could be a therapeutic target for AD.

Keywords : Alzheimer, tauopathy, Golgi, fragmentation, hyperphosphorylation, extracellular Tau

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
1. Introduction.....	1
1.1. La maladie d'Alzheimer.....	1
1.1.1. Caractérisation et aspects cliniques.....	1
1.1.2. Les principales marques histopathologiques.....	2
1.1.2.1. Le dysfonctionnement synaptique.....	2
1.1.2.2. L'atrophie cérébrale.....	2
1.1.2.3. Les plaques séniles.....	3
1.1.2.4. Les NFTs.....	6
1.1.2.5. Amyloïdose vasculaire.....	7
1.1.2.6. Perturbation du système endolysosomal.....	8
1.2. La protéine Tau.....	10
1.2.1. Structure du gène et de la protéine.....	10
1.2.2. Localisation.....	13
1.2.3. Les mutations de Tau.....	14
1.2.4. Les modifications post-traductionnelles.....	15
1.2.4.1. Par les kinases.....	15
1.2.4.2. Par les phosphatases.....	18
1.2.4.3. Les autres modifications.....	19
1.2.5. Les fonctions de Tau.....	19

1.2.5.1.	Signalisation cellulaire.....	19
1.2.5.2.	Maturation des neurones.....	20
1.2.5.3.	Liaisons aux MTs.....	22
1.2.5.3.1.	Via le MTBD.....	22
1.2.5.3.2.	Via le domaine de projection.....	23
1.2.6.	Tau en condition pathologique.....	23
1.2.6.1.	Hyperphosphorylation.....	23
1.2.6.2.	Agrégation.....	25
1.2.6.3.	Propagation de la pathologie.....	26
1.2.7.	Sécrétion de Tau.....	28
1.2.7.1.	En condition physiologique.....	30
1.2.7.2.	En condition pathologique.....	30
1.3.	L'appareil de Golgi.....	31
1.3.1.	Découverte.....	31
1.3.2.	Structure.....	31
1.3.3.	Fonctions.....	34
1.3.3.1.	Maturation des protéines synthétisées dans le RE.....	34
1.3.3.2.	Endocytose et sécrétion.....	36
1.3.3.3.	Autres fonctions.....	37
1.3.4.	Fragmentation de l'appareil de Golgi.....	38
1.3.4.1.	En condition physiologique.....	38
1.3.4.2.	En condition pathologique.....	39
1.3.4.3.	Altérations de la fonction Golgienne.....	41
1.3.4.3.1.	Transport antérograde.....	41
1.3.4.3.2.	Transport rétrograde.....	42
1.3.4.4.	A β et le Golgi.....	42
1.4.	Objectifs de l'étude.....	45
2.	Matériel et Méthode.....	47
2.1.	Culture cellulaire.....	47
2.2.	Plasmides.....	47

2.3.	Transfection	48
2.4.	Immunoprécipitation pour enlever la Tau du milieu de culture	48
2.5.	Immunobuvardage (IB).....	50
2.5.1.	Technique.....	50
2.5.1.1.	Récolte	50
2.5.1.2.	Dosage de protéines	51
2.5.1.3.	Migration sur gel.....	51
2.5.2.	Quantification	52
2.6.	Immunofluorescence (IF).....	52
2.6.1.	Technique.....	52
2.6.2.	Quantification	53
3.	Résultats.....	56
3.1.	L'appareil de Golgi est fragmenté plus tôt suite à la surexpression de Tau hyperphosphorylée.....	56
3.1.1.	Morphologie et surface de l'appareil de Golgi 48h post-transfection	56
3.1.2.	Morphologie et surface de l'appareil de Golgi 30h post-transfection	58
3.2.	La Tau extracellulaire est capable d'induire une fragmentation Golgienne.....	61
3.2.1.	La Tau hyperphosphorylée est majoritairement sécrétée, que ce soit à 30h ou bien 48h post-transfection.....	61
3.2.2.	L'application de milieu contenant de la Tau hyperphosphorylée sur des cellules HeLa induit une fragmentation de l'appareil de Golgi.....	63
3.2.3.	Confirmation de la fragmentation Golgienne par la Tau GFP-E12 extracellulaire	66
3.2.4.	Phénomène dose-dépendent.....	69
3.2.5.	La Tau extracellulaire, probable responsable de la fragmentation Golgienne.....	73
3.3.	Le domaine de liaison aux microtubules et la fragmentation Golgienne.....	75
3.3.1.	La surexpression de la partie carboxy-terminale de Tau induit une importante fragmentation Golgienne	75
3.3.2.	La surexpression de Tau ne modifie pas la stabilité des microtubules dans les cellules HeLa	77

3.4. La surexpression de GFP-T4R dans les cellules HeLa n'impact pas le transport de la protéine VSVG à la membrane plasmique.....	80
3.4.1. Impact de la température sur le transport de VSVG	80
3.4.2. L'appareil de Golgi demeure fonctionnel lors de la surexpression de GFP-T4R	81
4. Discussion	85
4.1. Résumé des résultats	85
4.2. La Tau hyperphosphorylée induit plus rapidement une fragmentation Golgienne.....	86
4.3. Contribution de la Tau extracellulaire à la fragmentation de l'AG	87
4.4. Voies de signalisation activées par la Tau extracellulaire qui pourraient induire la fragmentation du Golgi	89
4.5. Suivi temporel de la fragmentation du Golgi induite par Tau	90
4.6. Contribution de la Tau intracellulaire à la fragmentation de l'AG.....	91
4.7. Vérification de la fonctionnalité de l'AG	93
4.8. Contribution de la fragmentation du Golgi induite par la Tau extracellulaire dans la propagation de Tau dans le cerveau	94
4.9. Avantages et limitations du modèle cellulaire	95
4.10. Perspectives futures	96
4.11. Conclusion	97
Figures supplémentaires.....	98
Bibliographie.....	100

Liste des tableaux

Tableau I. <u>Liste des kinases principalement impliquées dans la phosphorylation aberrante de Tau dans la MA</u>	17
Tableau II. <u>Tableau des différents anticorps utilisés pour l'immunobuvardage et l'immunofluorescence</u>	54

Liste des figures

Figure 1. <u>Visualisation de l'atrophie cérébrale en cas de MA</u>	2
Figure 2. <u>Plaques séniles</u>	4
Modifié de « Trends in Molecular Medicine vol.11 no.4 April 2005 ».....	4
Immunomarquage des plaques amyloïdes réalisé avec un anticorps spécifique anti-A β 42.....	4
Figure 3. <u>Progression des plaques amyloïdes</u>	4
Figure 4. <u>Clivages alternatifs de l'APP</u>	5
Figure 5. <u>NFTs</u>	6
Modifié de « Trends in Molecular Medicine vol.11 no.4 April 2005 ».....	6
Figure 6. <u>Gène mapt humain et transcrit primaire</u>	11
Figure 7. <u>Isoformes humaines de la protéine Tau</u>	12
Figure 8. <u>Domaines de la plus longue isoforme humaine de Tau</u>	12
Figure 9. <u>Sites de phosphorylation de Tau chez les patients Alzheimer</u>	16
Figure 10. <u>Progression de la pathologie de Tau à travers le cerveau</u>	27
Figure 11. <u>Schéma de sécrétion non-conventionnelle possible de la protéine Tau</u>	29
Figure 12. <u>Schéma de la structure de l'appareil de Golgi</u>	33
Figure 13. <u>Schéma d'addition ou de suppression des sucres à travers le Golgi</u>	36
Figure 14. <u>Représentation schématique du cercle vicieux entre Aβ et la fragmentation de l'AG dans la MA</u>	44
Figure 15. <u>Schéma du protocole utilisé pour enlever le Tau du milieu de culture par immunoprécipitation</u>	49
Figure 16. <u>Surface de l'appareil de Golgi TP 48h</u>	57
Figure 17. <u>Morphologie et surface de l'appareil de Golgi TP 30h</u>	59
Figure 18. <u>Morphologies de l'AG selon le TP et la phosphorylation de Tau</u>	60
Figure 19. <u>Sécrétion des mutants GFP-E12 et GFP-A12 avec GFP-T4R=1, TP30h et 48h</u>	62
Figure 20. <u>Confirmation de la présence de Tau par WB, Tau extracellulaire</u>	64
Figure 21. <u>Résultats de l'effet de la Tau extracellulaire sur la morphologie du Golgi</u>	65
Figure 22. <u>Analyse par WB des échantillons de l'IP</u>	67
Figure 23. <u>Pourcentage de Golgi fragmentés, expérience avec IP</u>	68

Figure 24.	<u>Schéma du protocole utilisé pour les expériences de dilution du milieu GFP-E12</u>	
		70
Figure 25.	<u>Confirmation de la dilution de Tau extracellulaire par WB</u>	71
Figure 26.	<u>Dose-dépendance du phénomène de fragmentation par la Tau GFP-E12 extracellulaire, tendance sur 2(n)</u>	72
Figure 27.	<u>Comparaison du nombre de cellules avec Golgi fragmenté au TP30h et expérience Tau extracellulaire</u>	74
Figure 28.	<u>Pourcentage de Golgi fragmentés suite à la surexpression de GFP-Nt et GFP-Ct76</u>	
Figure 29.	<u>Expression de la tubuline totale, acétylée et tyrosylée</u>	78
Figure 30.	<u>Ratio « Tubuline acétylée / Tubuline totale » et « Tubuline tyrosylée / Tubuline totale »</u>	79
Figure 31.	<u>Confirmation de la relation entre la température et la distribution de la protéine VSVG</u>	81
Figure 32.	<u>Distribution de la protéine RFP-VSVG dans un cas de surexpression de Tau</u>	82
Figure 33.	<u>Distribution de la protéine VSVG selon la température</u>	83
Figure 34.	<u>Schéma récapitulatif du cercle vicieux hypothétique de fragmentation Golgienne concernant la pathologie de Tau</u>	97

Liste des sigles et abréviations

A β : amyloïde-bêta

ADN : acide désoxyribonucléique

AG : appareil de Golgi

APP : « *amyloid precursor protein* », protéine précurseur d'amyloïde

ARF1 : facteur d'ADP-ribosylation 1

ARNm : acide ribonucléique messenger

BFA : brefeldin A

BSA : « *bovin serum albumin* », albumine de sérum bovin

CDG : « *congenital disorders of glycosylation* », troubles congénitaux liés à la glycosylation

CK : créatine kinase

COG : « *conserved oligomeric Golgi (complex)* », complexe conservé oligomérique Golgien

COP : « *coat protein complex* », complexe de protéine de coating

Cterm : carboxyterminal(e)

ERGIC : « *ER-Golgi intermediate compartment* », compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi

FTDP : « *fronto-temporal demencia with Parkinsonism* », démence fronto-temporale avec Parkinsonisme

GaIT : β -1,4 galactosyltransférase

GFP : « *green fluorescent protein* », protéine fluorescente verte

GJ : « *gene juice* »

GPI : glycosylphosphatidylinositol

GTP : guanosine tri-phosphate

HRP : « *horseradish peroxidase* »

IB : immunobuvardage

IF : immunofluorescence

IP : immunoprécipitation

IRM : imagerie à résonance magnétique

KO : « *knock out* »

LRRK2 : « *leucine-rich repeat kinase 2* », kinase 2 à répétition enrichie en leucine

MA : maladie d'Alzheimer

MannII : α -1,3-1,6-mannosidase II

MAPs : « *microtubule associated proteins* », protéines associées aux microtubules

MTBD : « *microtubule binding domain* », domaine de liaison aux microtubules

MTs : microtubules

MVBs : « *multivesicular bodies* », corps multivésiculaires

NAGT I : N-acétylglucosaminyl transférase I

NFTs : « *neurofibrillar tangles* », enchevêtrements neurofibrillaires

NGS : « *normal goat serum* », sérum de chèvre

NIH : « *national institute of health* », institut national de la santé

Nterm : aminoterminal(e)

PAPS : phospho-adénosine phospho-sulfate

PDPK : « *prolin-directed protein kinases* », protéines kinases dirigés contre les prolines

PFA : paraformaldéhyde

PHF : « *paired helical filament* », fragments hélicaux pairés

PLC γ : phospholipase C γ

Pmn : « *progressive motor neuropathy* », neuropathie motrice progressive

PPP : phosphoprotéine phosphatase

PRD : « *prolin rich domain* », domaine riche en proline

PT : « *pre-tangles* », pré-enchevêtrements

PTP : protéine tyrosine phosphatase

P35 : pétris de 35mm de diamètre

P100 : pétris de 100mm de diamètre

RE : réticulum endoplasmique

RFP : « *red fluorescent protein* », protéine de fluorescence rouge

SialylT : α -2,6 sialyltransférase

SDC : sodium deoxycholate

SLA : sclérose latérale amyotrophique

SNAP : « *soluble NSF attachment protein* », protéine d'attachement de NSF soluble

SNARE : « *SNAP receptor* », récepteur SNAP

SOD : superoxyde dismutase

TBCE : « *tubulin-binding cofactor E* », cofacteur E de liaison à la tubuline

TGN : « *trans Golgi network* », réseau trans Golgien

TPK : « *tyrosine protein kinase* », protéine kinase ciblant les tyrosines

TP : « *time-point* »

VTC : « *vesicular tubular cluster* », compartiment de transport tubulo-vésiculaire

WB : « *western blot* »

À Adrien.

Remerciements

Je tenais à remercier plusieurs personnes sans qui les deux ans de maîtrise qui viennent de s'écouler n'auraient pas été les mêmes.

Tout d'abord je remercie ma directrice de recherche, la Dre Nicole Leclerc pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire et d'approfondir mes connaissances en neurosciences et particulièrement sur la maladie d'Alzheimer. Depuis mon premier cours avec le Dr Laurent Lescaudron à l'Université de Nantes je savais que je voulais me spécialiser dans ce domaine, et Nicole a rendu cela possible.

Merci également aux membres de mon jury de mémoire, Dr Karl Fernandes et Dr Roger Lippé, pour la lecture et l'évaluation de ce mémoire. De la même façon je remercie les membres de mon comité de parrainage, Dr Roger Lippé et Dr Alex Parker, qui m'ont conseillé et apporté leur expertise tout au long de ma maîtrise.

Un immense merci aux membres du laboratoire présents et passés : Dr Sarika Garg, Dr Lilia Rodriguez et plus particulièrement les Dr Alexandre Desjardins et Dr Nguyen-Vi Mohamed. Alex, merci pour tes conseils et ta bonne humeur quotidienne. Vi, tu aura vraiment été le maître Yoda de ces deux ans, et avoir été ton petit Padawan était un vrai bonheur. Si notre Team-Tau était parfois bruyante, nos rires ont résonné plus d'une fois dans les couloirs et ont vraiment permis de vivre avec plus de douceur les péripéties d'une maîtrise.

Merci à Manon Livernois et Carline Roussel d'être les bonnes fées du 9^{ème} étage, et de voler au secours des petits oiseaux perdus qu'il nous arrive d'être. Merci également à Susy Daigle pour ses conseils et son soutien administratif en tant que TDGE à l'Université de Montréal. Merci à Florence Dotigny du laboratoire du Dre Adrianna DiPolo pour m'avoir permis l'accès au microscope à fluorescence.

Je remercie également les étudiants du Centre de Recherche du CHUM et de l'Université de Montréal pour leur énergie et cohésion, ainsi que pour nos longues discussions qu'elles soient scientifiques (parfois) ou moins scientifiques (souvent). Parmi eux, je remercie particulièrement Loïc, Catherine-Alexandra, Alexandra, Marius, Yousra, Marc-André,

Arnaud, Lamia, Pegah, Negar, Dominique et Nabia, pour leur amitié, leur soutien et leurs sourires.

Merci à ma stagiaire d'été Andréa-Anne, dont la bonne humeur communicative ne peut que la porter ou elle le souhaite. Qu'il est facile de transmettre quand on a face à soit une telle étudiante.

De façon plus globale, je remercie les Université de Nantes et de Sherbrooke au sein desquelles j'ai pu construire une vie étudiante épanouissante et riche, tout aussi bien d'un point de vue scientifique qu'humain.

Je remercie également mon premier instituteur de sciences, Bruno Sartori, pour avoir fait naître en moi une envie de savoir et une passion pour la biologie dès mon plus jeune âge. Il est l'exemple même que la sensibilisation des enfants, même les plus petits, aux sciences en général est essentielle et qu'il suffit d'un peu de passion et d'envie de transmettre pour créer une vocation.

Merci à Catherine qui a été l'une des 7 colocataires avec qui la vie Montréalaise m'a faite vivre. Merci pour ton soutien, nos débats et nos échanges.

Merci à Mary-Pier ainsi qu'à sa famille : Alain, Danielle et Jonathan. Avoir la chance de côtoyer une si belle famille aura adouci les 7000km qui me séparent des miens.

Merci aux voix qui m'ont accompagnées durant les longues heures et journées passées au microscope, et plus particulièrement celles de : Fabrice Drouelle, Pascal Dervieux, Vanessa Descouraux, Charline Vanhoenacker, Alex Vizorek, Guillaume Meurice, Frédéric Fromet, Juliette Arnaud, Ophélie Vivier, Guillaume Galienne, Daniel Morin, Augustin Trapenard, Michèle Guigon, Nicolas Stoufflet et François-Régis Gaudry.

Merci également aux mots de Patti Smith qui m'auront épaulé durant la rédaction de ce mémoire.

Merci à Paula pour nos bières, nos pertitions dans l'Internet et son amitié. Merci à Juliette, pour avoir toujours été là. Merci à Claire et à Emeline, qui sont la preuve vivante que les coups de foudre en amitié existent. Merci à Jean, à Sophie, à Tristan, à Thomas, à Martha,

à Emmanuelle, à Arnaud, à Vincent et Laura, à Hugo, à la tribu de Sherbrooke et à celle de Nantes. Merci aux amitiés anciennes et nouvelles, à celle que les kilomètres n'effacent pas.

Cette aventure n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille.

Merci à mes grands-parents pour leur amour et plus particulièrement à Mamie et ses découpes d'articles scientifiques dans les journaux.

Merci à Lisa, la plus merveilleuse des sœurs que l'on puisse rêver d'avoir et que j'aime plus que tout.

Merci à Maman et Papa pour m'avoir permis de partir loin dans les meilleures conditions possibles, pour m'avoir soutenue, et pour faire de ma sœur et moi les filles les plus chanceuses au monde.

Enfin, merci à Adrien, mon « partner in crime ». Merci de ton soutien et de ta confiance aveugle, merci d'avoir su trouver les mots dans les moments de joie comme dans les moments difficiles, ainsi que pour m'avoir prodigué thé et petits plats en quantité illimitée durant la rédaction de ce mémoire. Tu es de ceux qui rendent tout plus facile et dont le monde dans lequel nous vivons a besoin.

1. Introduction

1.1. La maladie d'Alzheimer

1.1.1. Caractérisation et aspects cliniques

C'est en novembre 1906 que le Docteur Alois Alzheimer présente en qualité de psychiatre et neurologue le suivi qu'il a fait d'une patiente récemment décédée, Auguste Deter (Torack 1979). Sur 5 ans, il a pu observer son déclin cognitif progressif, accompagné de troubles du comportement et de l'humeur ainsi que d'hallucinations, symptômes qu'il apparente à des cas de démence sénile bien que la patiente ne soit âgée que d'une cinquantaine d'années (Alzheimer 1991; Alzheimer, Förstl, and Levy 1991; Cipriani et al. 2011). Suite à son décès en avril 1906, il effectue une autopsie de son cerveau et met en évidence deux types de lésions, à savoir des plaques séniles extracellulaires et des enchevêtrements neurofibrillaires (« neurofibrillary tangles », NFTs) intracellulaires. Depuis, des liens ont été mis en évidence entre ces lésions et les symptômes cognitifs observés dans ce qui est désormais appelé maladie d'Alzheimer (MA) (Maurer, Volk, and Gerbaldo 1997).

D'un point de vue clinique, un des premiers symptômes est l'affection de la mémoire à court terme traduisant une atteinte des neurones de l'hippocampe. La maladie s'étendant progressivement dans les régions corticales du cerveau, les pertes de mémoire sont ensuite progressivement accompagnées de troubles du comportement, de l'humeur, de difficultés de réflexion, mais également de troubles du langage (aphasie), de la reconnaissance (agnosie) et des mouvements (apraxie). Ces symptômes ont ultimement pour conséquence une perte d'autonomie totale des patients, qui décèdent dans les 10 à 15 ans suivant le diagnostic présumé, le plus souvent de pathologie pulmonaire comme la pneumonie. En effet, un diagnostic définitif de MA n'est posé qu'après le décès du patient, par autopsie.

1.1.2. Les principales marques histopathologiques

1.1.2.1. Le dysfonctionnement synaptique

On observe de façon très précoce dans la MA une perte de l'intégrité des synapses, et donc de leur fonctionnement (Nesticò et al. 2012; Marcello et al. 2012; C.-C. Liu et al. 2014; Cowan et al. 2010; Tu et al. 2014; Polydoro et al. 2014). Un exemple réalisé sur modèle animal (rat) tend à montrer que l'activité synaptique du cortex préfrontal se retrouve débalancée lors de perte de mémoire et de déclin cognitif sur sujets âgés (Bories et al. 2013), avec une tendance à l'augmentation de signaux inhibiteurs au niveau synaptique, par l'intermédiaire du GABA-A. Au long terme, une des conséquences de ces dysfonctionnements synaptiques est la mort neuronale.

1.1.2.2. L'atrophie cérébrale

L'une des caractéristique de la MA est la mort neuronale, qui résulte ultimement en une atrophie cérébrale. Il est possible de faire un suivi de cette atrophie via l'imagerie à résonance magnétique (IRM) (figure 1), qui peut alors servir comme outil diagnostique (Pegueroles et al. 2016; Del Sole, Malaspina, and Magenta Biasina 2016). On l'observe à des stades précoces de la maladie au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal, pour progressivement atteindre les régions corticales jusqu'à entraîner une dilatation importante des ventricules.

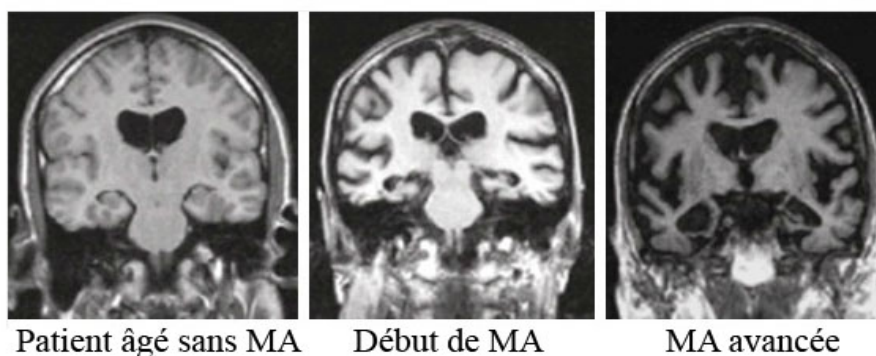


Figure 1. Visualisation de l'atrophie cérébrale en cas de MA

Modifié de « Human anatomy and physiology », 8^{ème} édition (Hoehn and Marieb 2010)

1.1.2.3. Les plaques séniles

Les plaques séniles sont des dépôts extracellulaires d'amyloïde- β ($A\beta$) agrégée sous forme de feuillets β pour former ce que l'on appelle également des dépôts amyloïdes (Glennner and Wong 1984) (figure 2). Ces plaques progressent en se basant sur les voies neuroanatomiques, de façon antérograde, selon une séquence précise (Thal et al. 2002). Elles apparaissent tout d'abord au niveau des régions néocorticales, puis progressent vers le cortex entorhinal, le cortex insulaire, l'hippocampe, les régions sous-corticales puis ultimement le tronc cérébral et le cervelet (figure 3).

Ces dépôts amyloïdes ont été caractérisés par une étude de 2013 (Kayed and Lasagna-Reeves 2013) comme étant moins toxiques pour les neurones que les oligomères libres du peptide $A\beta$. Ces derniers sont issus du clivage de la protéine précurseur d'amyloïde (APP), une protéine transmembranaire de type I dont 3 isoformes contiennent la séquence $A\beta$ (APP 695, APP 751, APP 770). Deux voies de clivage existent alors : la voie de clivage amyloïdogénique qui donne naissance au peptide $A\beta$, et la voie non-amyloïdogénique qui donne naissance au fragment « p3 » (Zheng and Koo 2006) (figure 4). Que ce soit pour produire $A\beta$ ou bien p3, APP subit 2 clivages protéolytiques. Dans le cas de la voie amyloïdogénique, les enzymes impliquées sont la β -sécrétase et la γ -sécrétase, et pour la voie non-amyloïdogénique il s'agit de la α -sécrétase et de la γ -sécrétase (Zhou et al. 2011). Le fragment alors généré par la voie non-amyloïdogénique aurait des propriétés neuroprotectrices, contrairement aux oligomères $A\beta$ (Zhou et al. 2011; Kayed and Lasagna-Reeves 2013). Les oligomères $A\beta$ peuvent avoir différentes conformations, entraînant à la fois différents niveaux de toxicité et différents agencements, comme les plaques, les fibres ou encore les anneaux fibrillaires (Kayed and Lasagna-Reeves 2013).

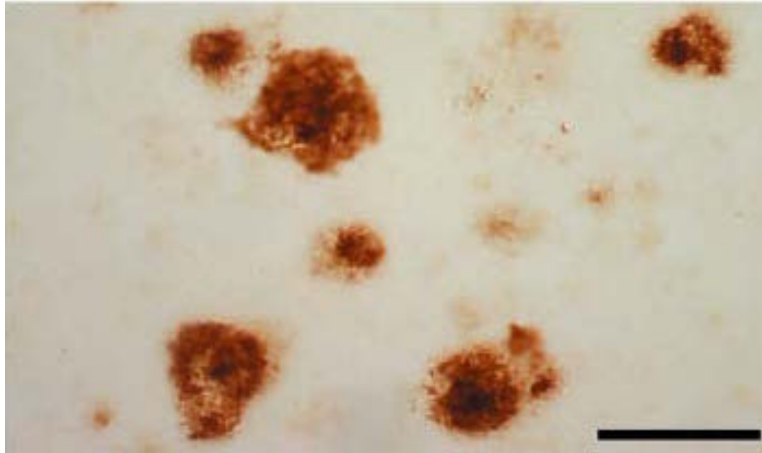


Figure 2. Plaques séniles

Modifié de « Trends in Molecular Medicine vol.11 no.4 April 2005 », échelle = 125 μ m.

Immunomarquage des plaques amyloïdes réalisé avec un anticorps spécifique anti-A β 42

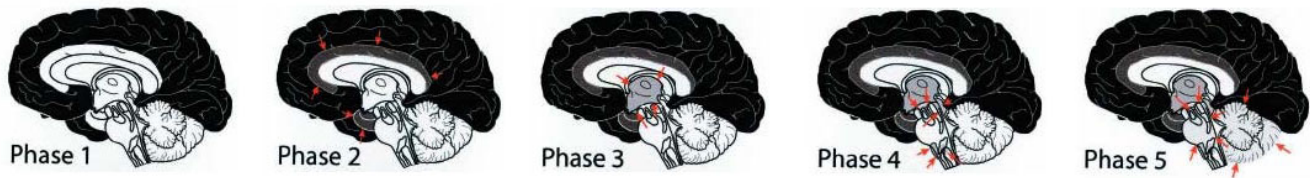


Figure 3. Progression des plaques amyloïdes

Issu de (Thal et al. 2002)

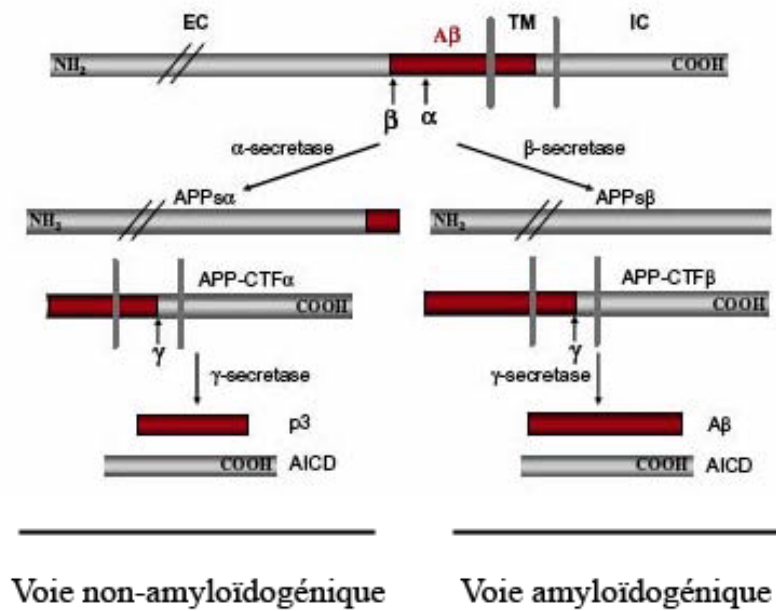


Figure 4. Clivages alternatifs de l'APP

Modifié de Zheng et Koo (Zheng and Koo 2006)

EC : extracellulaire, IC : intracellulaire, TM : trans-membranaire

1.1.2.4. Les NFTs

Si les plaques séniles sont l'un des premiers types de lésion observé dans le cerveau des patients souffrant de la MA, les NFTs sont le second – on parle également de dégénérescence neurofibrillaire. Intracellulaires, les NFTs sont composés de protéine Tau hyperphosphorylée, formant des filaments d'une dizaine de nanomètres de diamètre prenant la forme d'hélice (« paired helical filament », PHF, figure 5) (Brion 1999; Brion, Flament-Durand, and Dustin 1986; Brion et al. 1985). Dans un premier temps, la protéine Tau normalement localisée au niveau de l'axone se voit relocalisée au niveau du corps cellulaire du neurone, on parle alors de « pre-tangles » (PT, pré-enchevêtrements). On ne parle de NFTs qu'une fois les filaments formés.

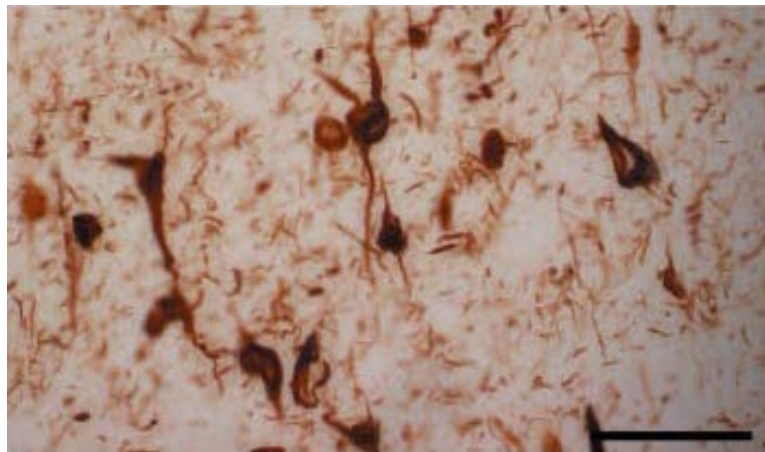


Figure 5. NFTs

Modifié de « Trends in Molecular Medicine vol.11 no.4 April 2005 », échelle = 62,5µm.

Immunomarquage des NFT réalisé avec un anticorps spécifique anti-PHF1

Plusieurs controverses existent concernant les plaques séniles et les NFTs, notamment pour savoir si une lésion apparaît plus précocement qu'une autre. Si le rôle de Tau dans la MA sera abordé plus en détail plus loin dans cette introduction, nous pouvons quand même dire que l'implication de la pathologie de Tau dans la MA est très cohérente pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, on sait que même si l'on tente de limiter ou bien réduire la quantité de A β chez les patients avec une technique d'immunisation, cela ne permet ni une limite du déclin cognitif, ni une limitation de la propagation de la pathologie de Tau (Small and Duff 2008). Si ceci peut être du au fait que des études ont montré une apparition de plaques séniles ou tout du moins de fibres d'A β avant les NFTs (Götz et al. 2001), forcé de constater que l'on observe une meilleure corrélation entre l'apparition des NFTs et la propagation de la pathologie de Tau avec le déclin cognitif des patients comparativement avec l'apparition et la propagation des plaques séniles (Duyckaerts et al. 1997).

Cependant, Tau semble également jouer un rôle dans la toxicité de A β , comme le montre une étude où la réduction de Tau endogène entraîne une diminution des problèmes comportementaux chez des souris transgéniques exprimant l'APP humaine, sans cependant modifier le taux d'A β présent dans le cerveau des animaux (Roberson et al. 2007). La même étude reconnaît également que malgré ces résultats, la diminution de Tau a la capacité d'enrayer la dysfonction neuronale causée par A β , et cette dualité rejoint la conclusion de Small et Duff, à savoir qu'il paraît impossible de pouvoir un jour trouver un traitement à la MA en considérant la pathologie amyloïde et la pathologie de Tau séparément. Enfin, on retrouve des NFTs dans différentes tauopathies (Clavaguera, Grueninger, and Tolnay 2014; Spillantini and Goedert 1998) comme le syndrome de Down et la démence fronto-temporale associée au parkinsonisme, et une meilleure compréhension de leur formation, leur impact sur la physiologie du neurone, ainsi que leur propagation à travers le cerveau, pourra donc être bénéfique pour plusieurs champs d'étude.

1.1.2.5. Amyloïdose vasculaire

En plus des inclusions intra et extracellulaires comme les NFTs ou bien les plaques séniles, on observe chez les patients Alzheimer des dépôts amyloïdes au niveau du système cérébrovasculaire. Ce phénomène a donné naissance à une hypothèse vasculaire qui serait à l'origine de la MA, qui serait déclenché par dommage de la vascularisation cérébrale, comme une hypovascularisation (oligémie) ou encore un dysfonctionnement de la barrière hématoencéphalique (Zlokovic 2011). Ces deux dommages vont avoir comme conjoncture une

disfonction neuronale en passant notamment par la voie amyloïdogénique. En effet, l'hypovascularisation entraîne une augmentation de l'expression d'APP et de la production d'A-beta, alors que la barrière hématoencéphalique altérée diminue son élimination. De plus, ces dommages à la vascularisation cérébrale entraînent une accumulation de molécules neurotoxiques qui contribuent au dysfonctionnement neuronal. Cette hypothèse se place donc de façon précoce dans la MA et est également soutenue par des études sur la pathologie de Tau. En effet, une étude récente (Merlini, Wanner, and Nitsch 2016) a même montré que le remodelage cérébrovasculaire causé par Tau, et plus précisément artériel, observé chez les patients Alzheimer précède l'angiopathie amyloïde. L'étude propose que les phénomènes de modification de la paroi des vaisseaux sanguins aient pour conséquence l'angiopathie amyloïde cérébrale que l'on observera plus tardivement. Par ailleurs, une étude plus ancienne (Lippa et al. 1993) avait déjà montré que il n'y a pas de corrélation directe entre la densité des plaques séniles / NFTs et l'amyloïdose vasculaire, soutenant l'idée que les dommages et les dépôts amyloïdes observés au niveau des vaisseaux sanguins pourraient être des événements en amont des plaques amyloïdes et NFTs. L'hypothèse vasculaire se place donc de manière précoce dans la cascade pathologique menant à la MA.

1.1.2.6. Perturbation du système endolysosomal

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication des lysosomes dans la pathogénèse de la MA (Zhang, Sheng, and Qin 2009; S. Lee, Sato, and Nixon 2011), donnant naissance à l'hypothèse selon laquelle la déposition et la dégradation protéique anarchique pourrait contribuer à l'initiation de la neurodégénérescence. Le rôle central de dégradation des lysosomes à travers l'endocytose, la phagocytose ou l'autophagie a notamment été appuyé par une étude (S. Lee, Sato, and Nixon 2011) montrant que l'inhibition de la protéolyse lysosomale entraîne une interruption du transport axonal causant une dystrophie axonale similaire à celle observée chez les patients Alzheimer. La même équipe a par ailleurs mis en évidence un échec des processus d'autophagie dans un contexte de MA (D. M. Wolfe et al. 2013). De plus, la perturbation du système endolysosomal pourrait effectivement contribuer à l'accumulation amyloïde observée dans la MA. On retrouve des hydrolases lysosomales au niveau des neurites dystrophiques qui se trouvent dans les plaques séniles, possible indication

d'une rupture lysosomale en amont (Sooyeon Lee, Sato, and Nixon 2011). De surcroît, il a été prouvé que le système endolysosomal possède une activité beta et gamma sécrétases, ce qui veut dire que ce système a la capacité de cliver l'APP (Bahr et al. 1994). Ces clivages génèrent des peptides contenant le fragment beta-amyloïde, qui sont par la suite dégradés par des cathepsines. C'est pourquoi l'inhibition des cathepsines a pour conséquences l'accumulation de fragments contenant le peptide amyloïde. Les perturbations du système endolysosomal sont également liées à la protéine Tau (Hamano et al. 2008), ces dernières entraînant la formation d'agrégats insolubles et d'oligomères de Tau au sein des lysosomes suite à l'application sur les cellules d'un agent lysosomotropique diminuant l'activité des cathepsines D, B et L, la chloroquine. De plus, il a été montré que des altérations au système endolysosomal avaient un impact sur la morphologie de l'appareil de Golgi, qui sera abordé plus loin dans ce mémoire (Kirkbride et al. 2012). Le système endolysosomal et ses perturbations semblent donc être liés à la fois à la pathologie de Tau et à la pathologie amyloïde, d'où l'importance de son observation en pathologie.

1.2. La protéine Tau

1.2.1. Structure du gène et de la protéine

Le gène humain *MAPT* codant pour la protéine Tau qui possède 16 exons se trouve sur le bras long du chromosome 17, plus précisément à la position 17q21, et s'étend sur plus de 130kb (figure 6). L'expression du gène varie, il est majoritairement exprimé dans le système nerveux central, mais il s'exprime également dans le système nerveux périphérique, et en plus faible proportion au niveau des muscles squelettiques, des reins, du coeur, et des poumons (Gu, Oyama, and Ihara 1996).

La protéine Tau est une longue protéine hydrophile qui appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (« microtubule associated proteins », MAPs) et son transcrit primaire possède 13 exons du fait de la non transcription des exons 4A, 6 et 8 dans le cerveau humain adulte (Andreadis, Brown, and Kosik 1992; M. Goedert et al. 1992; Sawa et al. 1994; Buée et al. 2000; Hirokawa, Shiomura, and Okabe 1988) (figure 6). Il existe 6 isoformes de Tau dans le cerveau adulte produits par épissage alternatif, qui sont composées de 353 à 441 acides aminés et dont le poids moléculaire varie entre 45 et 65 kDa (M. Goedert, Spillantini, Jakes, et al. 1989; M. Goedert, Spillantini, Potier, et al. 1989; M. Goedert and Jakes 1990) (figure 7). Ces isoformes diffèrent entre elles par la structure des régions amino (Nterm) et carboxyterminales (Cterm) de la protéine, régions entre lesquelles on retrouve un domaine enrichi en proline.

En effet, en Nterm les exons 2 et 3 codent pour l'absence ou bien la présence de 1 à 2 inserts, d'où l'appellation 0N / 1N / 2N que l'on retrouve lorsque l'on décrit une isoforme de Tau (Himmler et al. 1989; Buée et al. 2000; Sergeant et al. 2008). La partie Cterm de la protéine quant à elle contient les exons 9 à 12 et a la particularité de porter 3 ou 4 répétitions de 18 acides aminés, ce qui vient compléter l'appellation des isoformes de Tau par la mention 3R ou bien 4R (Buée et al. 2000; M. Goedert, Spillantini, Potier, et al. 1989). La présence de ces 3 ou 4 répétitions est due à l'épissage de l'exon 10 (F. Liu and Gong 2008, 10). Par exemple la nomenclature Tau3R0N indique que cette isoforme de Tau possède 3 répétitions en Cterm, sans aucun insert en Nterm – cette isoforme, la plus courte (353 acides aminés) a la

particularité d'être la seule isoforme de Tau à être exprimée dans le cerveau fœtal (Kosik et al. 1989).

Deux domaines principaux se distinguent dans la protéine Tau (figure 8). Le premier est composé de la partie Nterm ainsi que de la région enrichie en proline et est appelé domaine de projection. Il permet de définir l'espace entre les microtubules (MTs) via des liaisons à des protéines du cytosquelette (Chen et al. 1992; Hirokawa, Shiomura, and Okabe 1988). Le second est composé de la portion de la protéine avec les répétitions présentent en Cterm, c'est le domaine de liaison aux microtubules (« microtubule binding domain », MTBD) (Butner and Kirschner 1991; M. Goedert and Jakes 1990; Buée et al. 2000). Il est essentiel à la polymérisation des MTs, et à la stabilité du cytosquelette. Enfin, la protéine Tau est dite dipolaire du fait du caractère basique de la région Cterm et du caractère fortement acide de la partie comprenant les inserts en Nterm.

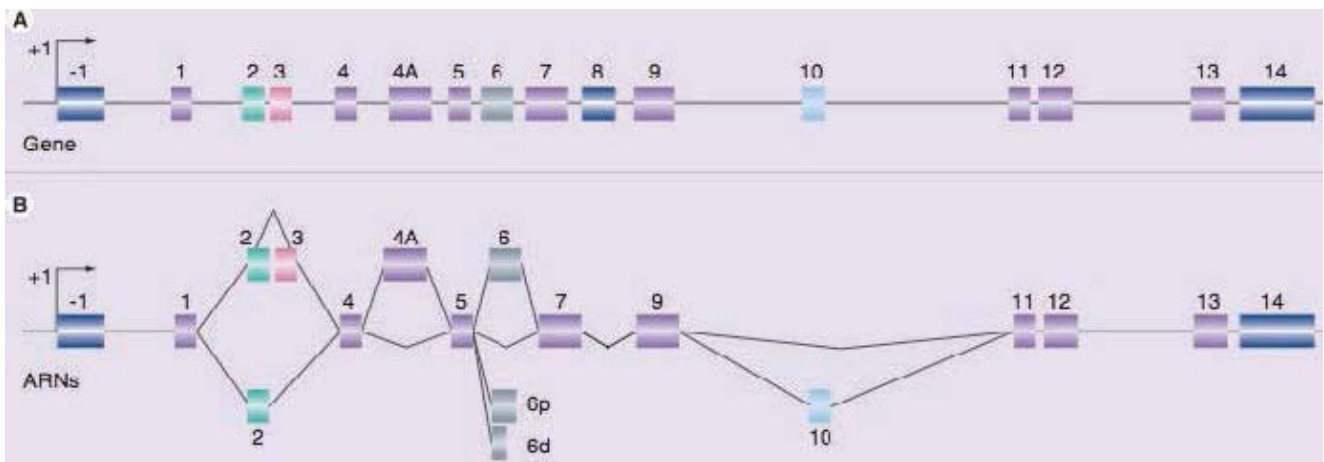


Figure 6. Gène mapt humain et transcrit primaire

Modifié de (Sergeant et al. 2008) - A : gène mapt humain ; B : transcrit primaire humain

Si le gène codant pour la protéine Tau possède 16 exons (dont le premier « -1 » appartient au promoteur), on en retrouve seulement 13 au niveau du transcrit primaire et ce à cause de l'absence de transcription des exons 4A, 6 et 8 (l'exon 4A est spécifique de la Tau du système nerveux périphérique). Cependant, l'exon -1 et l'exon 14 ne seront pas traduits. Les

exons 2, 3 et 10 sont quant à eux à l'origine des 6 isoformes de Tau, via des phénomènes d'épissage alternatif. Les exons présents dans les 6 isoformes de Tau sont appelés les exons constitutifs, et il s'agit des exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13.

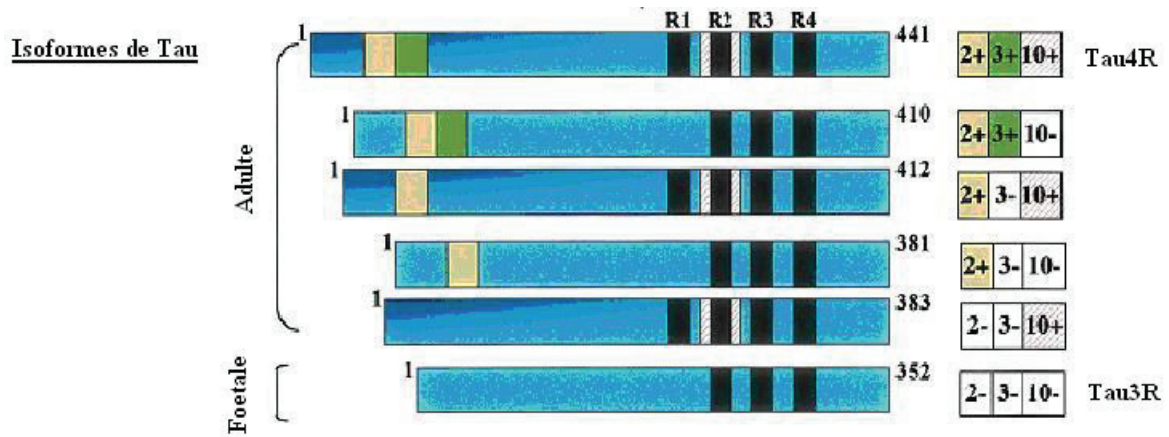


Figure 7. Isoformes humaines de la protéine Tau

Modifié de (Buée et al. 2000)

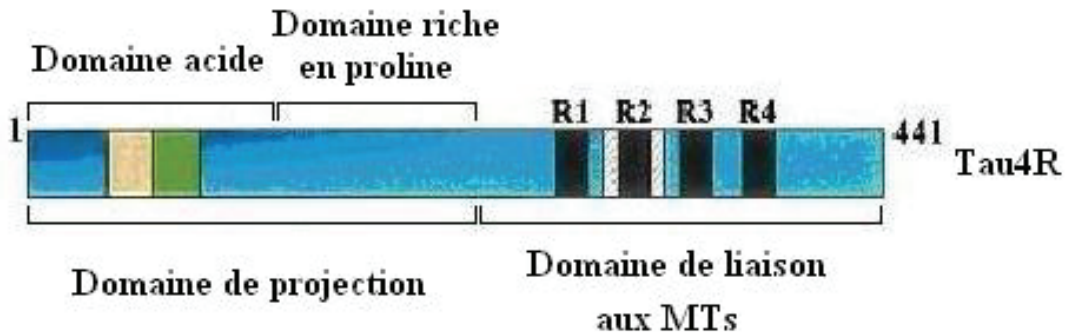


Figure 8. Domaines de la plus longue isoforme humaine de Tau

Modifié de (Buée et al. 2000)

1.2.2. Localisation

On retrouve principalement la protéine Tau au niveau des axones des neurones, et ce aussi bien pour l'isoforme fœtale que les 5 autres isoformes humaines adultes (Brion et al. 1988; Binder, Frankfurter, and Rebhun 1985; Brion, Flament-Durand, and Dustin 1986). On retrouve cependant la Tau à la fois dans l'axone et le corps cellulaire. La Tau présente au niveau du corps cellulaire du neurone y serait synthétisée, puis transportée le long de l'axone. Ce transport serait possible grâce à l'intervention de kinésines, des protéines mobiles et motrices qui se déplacent le long des MTs du soma vers le bouton axonal – on appelle cela le transport antérograde (Michelle A. Utton et al. 2005). Cette relation aux MTs apporte une autre explication à la localisation axonale de Tau, possiblement due à cette affinité avec la protéine (Hirokawa, Shiomura, and Okabe 1988). La Tau présente au niveau de l'axone pourrait également y être directement synthétisée, comme le laisse penser le signal de ciblage axonal présent dans la région 3' non traduite de son ARNm (Litman et al. 1993; Litman, Barg, and Ginzburg 1994; S. Aronov et al. 2001; Stella Aronov et al. 2002; Giuditta et al. 2008). En plus de l'ARNm, des ribosomes sont également présents au niveau de l'axone, ce qui favorise une synthèse locale de Tau directement au site cible qu'est l'axone, et plus particulièrement à son extrémité distale (M. M. Black et al. 1996).

Bien que la protéine Tau soit majoritairement retrouvée au niveau axonal, elle est également présente en moins grande quantité au niveau du compartiment somatodendritique des neurones ainsi qu'au niveau de leur noyau (Brady, Zinkowski, and Binder 1995; Papasozomenos and Binder 1987). Le plus souvent la localisation nucléaire de Tau est due à un stress oxydant. La Tau s'associe alors à l'ADN afin d'assurer un maintien de l'intégrité génomique. Ce rôle protecteur de Tau sur l'ADN a été confirmé en 2011, quand il a été observé qu'en absence de Tau lors d'un stress cellulaire les lésions à l'ADN sont nettement plus nombreuses (Sultan et al. 2011). De nombreuses autres études menées entre autres par le Dr Luc Buée ont permis de raffiner la liaison protectrice de Tau à l'ADN, notamment par des méthodes biochimiques (Violet et al. 2014; Violet et al. 2015; Qi et al. 2015; Mansuroglu et al. 2016).

1.2.3. Les mutations de Tau

Si les mutations au niveau du gène codant pour APP sont bien caractérisées (Hardy and Selkoe 2002), ce n'est qu'en 1998 que des études ont mis en évidence le fait que des mutations au niveau de la protéine Tau pouvaient être la cause de maladies neurodégénératives (Hong et al. 1998; Clark et al. 1998; Hutton et al. 1998; Poorkaj et al. 1998; Spillantini and Goedert 1998). Dans le cadre d'un suivi de 13 familles avec démence fronto-temporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17 (FTDP-17) autosomale dominante héréditaire, il a été investigué si oui ou non la protéine Tau (dont le gène se trouve sur le chromosome 17) présentait des mutations (Hutton et al. 1998). La FTDP-17 fut donc la première tauopathie (pathologie liée à Tau) à mettre en évidence des mutations de la protéine.

À ce jour une quarantaine de mutations ont été identifiées, divisées en 4 catégories (Michel Goedert 2004; M. S. Wolfe 2009). Les mutations dites faux-sens sont les plus nombreuses et entraînent la substitution d'un acide aminé par un autre, dans les exons 9 à 13. Suivent les mutations introniques, qui ciblent les introns suivant l'exon 9, et plus particulièrement l'exon 10. Des mutations dites silencieuses ont également été relevées au niveau de l'exon 10, mais elles n'aboutissent à aucun changement en terme de composition en acides aminés. Enfin, il existe une mutation de délétion à nouveau dans l'exon 10, qui entraîne la suppression d'un acide aminé.

D'un point de vue fonctionnel, ces mutations ont deux conséquences possibles (V. M. Lee, Goedert, and Trojanowski 2001; Buée et al. 2000; Michel Goedert 2004). La première est une altération de l'épissage alternatif qui a pour effet une augmentation de la production d'isoformes 4R. La seconde concerne la protéine et induit un changement dans sa séquence peptidique. Les tauopathies familiales restent cependant très rares, les formes sporadiques représentant la grande majorité des cas. Si les tauopathies sporadiques ne sont pas liées aux 4 types de mutations citées ci-dessus, une étude de 2004 a mis en évidence que du polymorphisme génétique dans le gène codant pour la protéine Tau pourrait être une cause de tauopathies sporadiques (Schraen-Maschke et al. 2004). On notera qu'on ne retrouve pas de mutation de Tau dans la MA.

1.2.4. Les modifications post-traductionnelles

1.2.4.1. Par les kinases

La protéine Tau est une protéine hautement phosphorylable, notamment à cause du fait qu'elle possède 85 sites de phosphorylation (D. P. Hanger, Anderton, and Noble 2009). On connaît actuellement une trentaine de kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau, chaque kinase reconnaissant de façon spécifique certains épitopes de la protéine (Martin, Latypova, Wilson, Magnaudeix, Perrin, Yardin, et al. 2013; J. Avila 2008; Sergeant et al. 2008). Ces kinases ciblent certains acides aminés de Tau à savoir les sérines, les tyrosines et les thréonines afin d'y ajouter un résidu phosphate (figure 9) (Jesus Avila et al. 2004). Certaines régions de la protéine Tau sont plus touchées par les phénomènes de phosphorylation, c'est le cas du domaine riche en proline et de l'extrémité Cterm de la protéine (figure 9). Tout comme les phosphatases, les kinases ont été classées en fonction de leur nature ainsi que de leur site dit consensus (Rust and Thompson 2011). La première famille concerne les kinases dirigées contre les prolines (PDPK, « prolin-directed protein kinases »), qui ont la particularité de cibler des sérines et des thréonines qui précèdent un résidu proline (Buée et al. 2000). La seconde famille englobe les kinases dites non dirigées contre les prolines (non PDPK), qui phosphorylent les sites qui ne sont pas suivis d'une proline (Morishima-Kawashima et al. 1995). Et enfin, la dernière famille de kinases touche les kinases ciblant les tyrosines (TPK, « tyrosine protein kinases ») (tableau I).

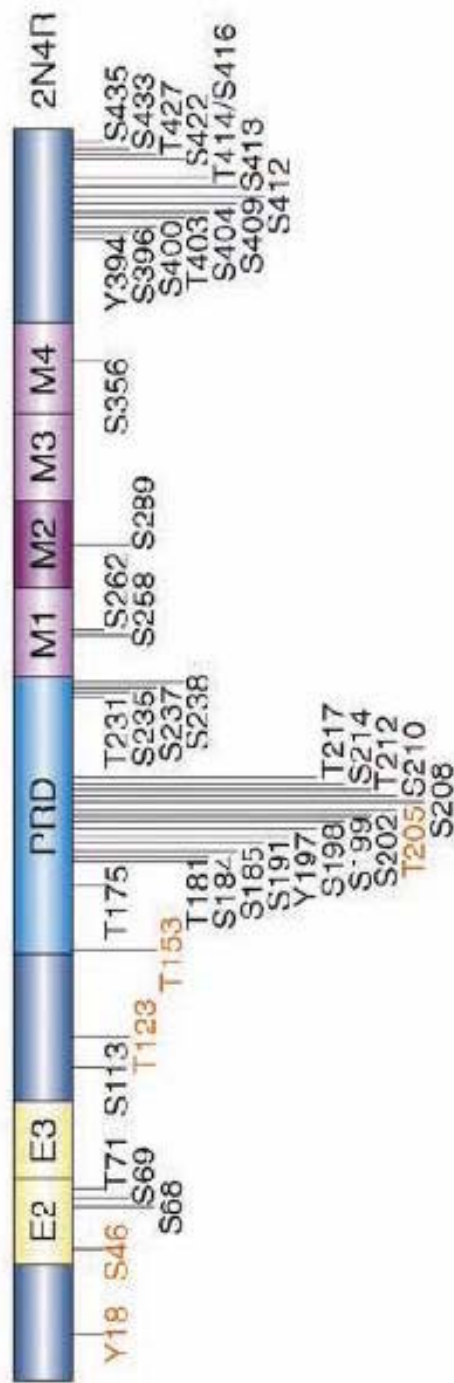


Figure 9. Sites de phosphorylation de Tau chez les patients Alzheimer

Modifié de (D. P. Hanger, Anderton, and Noble 2009)

PRD : domaine riche en proline

Famille de Kinases	Exemple de kinases impliquées dans la MA
PDPK	GSK3 (« glycogen synthase kinase-3 »), CDK5 (« cyclin-dependent protein kinase-5 »), MAPK (« mitogen-activated protein kinases »), ERK1 (« extracellular signal-regulated kinases 1 »), ERK2, JNK (« c-Jun N-terminal kinases »)
Non PDPK	TTBK1 (« tau-tubulin kinases 1 »), TTBK2, CK (caséine kinases), MARK (« microtubule affinity-regulating kinases »), PKA (protéine kinase A), Akt (protéine kinase B), PKC (protéine kinase C), CaMKII (« calmodulin-dependent protein kinases II »)
TPK	Src, Fyn

Tableau I. Liste des kinases principalement impliquées dans la phosphorylation aberrante de Tau dans la MA

Tableau créé à partir de la revue « Tau protein kinases : involvement in Alzheimer's disease » (Martin, Latypova, Wilson, Magnaudeix, Perrin, Yardin, et al. 2013) et (Scales et al. 2011; G. Lee et al. 1998)

1.2.4.2. Par les phosphatases

Les phosphatases sont des enzymes capables de déphosphoryler les sérines, tyrosines et thréonines des protéines (J. Avila 2008; Gong et al. 1993). On peut les classer selon la structure de leur site catalytique mais aussi de leur sensibilité aux inhibiteurs : les protéines tyrosine phosphatase (PTP), les phosphoprotéines phosphatase (PPP) ainsi que les protéines phosphatases dépendantes d'un ion métallique (le plus souvent du fer ou du zinc) (Gong et al. 1993). Il a été déterminé que dans un cerveau de sujet sain, c'est la phosphatase PP2A qui a l'activité la plus importante (71%), contre seulement 11% pour PP1, 10% pour PP5 (PPP) et 7% pour PP2B (F. Liu et al. 2005), et il se trouve que ces 4 phosphatases ainsi que la phosphatase PTEN (PTP) ont la capacité de déphosphoryler la protéine Tau (Martin, Latypova, and Terro 2011; Martin, Latypova, Wilson, Magnaudeix, Perrin, and Terro 2013). De plus PP2A est également la phosphatase majeure de Tau (Torrent and Ferrer 2012), ce qui vient à poser problème en cas de MA. En effet les patients Alzheimer présentent une activité des phosphatases réduites de 50% pour PP2A et de 20% pour PP5, entraînant une diminution de la déphosphorylation de la protéine Tau. En 2002, une équipe a émis l'hypothèse que l'hyperphosphorylation aberrante de Tau en cas de MA était possiblement due à un déséquilibre des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation découlant de la diminution d'activité de PP2A (Iqbal et al. 2002). Les répercussions étant une augmentation de la phosphorylation, une diminution de la déphosphorylation (J. Z. Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1996; Iqbal et al. 2002), et donc une augmentation de l'hyperphosphorylation menant à la pathologie de Tau, ce genre d'évènement est un parfait exemple du genre de cercle vicieux qui peut s'installer dans la MA.

1.2.4.3. Les autres modifications

D'autres modifications post-traductionnelles affectent la protéine Tau. C'est le cas de la glycosylation, qui consiste en l'ajout d'un oligosaccharide sur un résidu asparagine (N-glycosylation), thréonine ou sérine (O-glycosylation) (Robertson, Moya, and Breen 2004; Jesus Avila et al. 2004). En 2004, une étude a établie l'existence d'une corrélation inverse entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation de Tau dans des échantillons de cerveaux de patients Alzheimer (Robertson, Moya, and Breen 2004). Cette même étude a montré que des changements au niveau de la glycosylation, et plus particulièrement la O-glycosylation, de la protéine Tau pourraient influencer sa phosphorylation, ce qui a par la suite été validé par plusieurs autres études (Smet-Nocca et al. 2011; F. Liu et al. 2004; Yu et al. 2008). On a également observé des phénomènes de troncation de Tau par les caspases 3 et 6 (Basurto-Islas et al. 2008; Horowitz et al. 2004) notamment aux sites D13, E391, D421, donnant des formes tronquées de Tau que l'on retrouve dans le cerveau des patients Alzheimer (Siddhartha Mondragón-Rodríguez et al. 2008). Plusieurs autres phénomènes post-traductionnels affectant Tau ont également été décrits comme la déamination (Montejo de Garcini, Serrano, and Avila 1986), la N-méthylation des résidus de lysine (Wischik et al. 1988), l'oxydation, la sumoylation, l'ubiquitination, la polyamination, la nitration, la prolyl-isomérisation, l'acétylation et la glycation (Jesus Avila et al. 2004; Martin, Latypova, and Terro 2011).

1.2.5. Les fonctions de Tau

1.2.5.1. Signalisation cellulaire

L'implication de la protéine Tau dans des phénomènes de signalisation cellulaire fait partie d'un de ses rôles physiologiques qui est altéré lors de la MA. Elle est en effet capable de plusieurs interactions soulignant cette fonction. Tout d'abord, en se liant aux microfilaments d'actine ou filaments intermédiaires à l'aide de son domaine de projection, la protéine Tau assure une connexion entre le cytosquelette et la membrane plasmique (Miyata et al. 1986; Henríquez et al. 1995; Brandt, Léger, and Lee 1995). Ensuite, elle est impliquée à la fois dans l'établissement de la polarité neuronale et dans la croissance axonale, ce qui explique certains

défauts observés au niveau des neurones dans la plupart des tauopathies (Caceres and Kosik 1990; Caceres, Potrebic, and Kosik 1991; Leugers and Lee 2010). De plus, grâce à son domaine enrichi en prolines, la protéine Tau interagit avec l'une des enzymes centrale aux principales voies de signalisation, la phospholipase C γ (PLC γ), et plus particulièrement avec son domaine SH3 (Noh, Shin, and Rhee 1995; Jenkins and Johnson 1998; Hwang et al. 1996). Une étude de 2008 (Reynolds et al. 2008) a par ailleurs mis en lumière que l'interaction entre Tau et les molécules régulatrices des voies de signalisation était fortement affecté par le niveau de phosphorylation de la protéine Tau. La même étude a ainsi démontré que la phosphorylation de Tau retrouvé chez les patients Alzheimer pouvait réduire la liaison de la protéine au domaine SH3 de la PLC γ , impactant sérieusement la signalisation cellulaire dépendante de cette liaison. Une autre interaction existant entre la protéine Tau et un modulateur de la signalisation cellulaire est celle que Tau établie avec la sous-unité p85 α de la kinase PI3, une enzyme impliquée à la fois dans la croissance, la survie, la motilité et la prolifération cellulaire (Reynolds et al. 2008). D'autres kinases ont été identifiées comme étant également liées à Tau en signalisation cellulaire dans des conditions physiologiques, c'est le cas des kinases Lck, Fyn et Src (Scales et al. 2011). La kinase Fyn par exemple, en pathologie, suit la protéine Tau lors de la relocalisation au niveau du compartiment somatodendritique (Ittner et al. 2010). L'interaction qui se produit alors entre les récepteurs dendritiques NMDA et la kinase Fyn résulte en un phénomène d'excitotoxicité qui reflète bien les conséquences de l'altération de la fonction de signalisation cellulaire de Tau en condition pathologique.

1.2.5.2. Maturation des neurones

Une approche révélatrice dans l'étude de fonction d'une protéine est l'observation des phénomènes qui occurrent en son absence. C'est ce qu'ont choisi de faire différentes études (Caceres and Kosik 1990; Caceres, Potrebic, and Kosik 1991; Harada et al. 1994; Ikegami, Harada, and Hirokawa 2000) afin de raffiner les rôles de la protéine Tau. Une équipe s'est donc concentrée sur l'inhibition de l'expression de Tau en utilisant des oligonucléotides antisens ajoutés au milieu extracellulaire de neurones en culture (Caceres and Kosik 1990; Caceres, Potrebic, and Kosik 1991). Ils ont pu observer des défauts importants dans la

formation des neurites, mettant en lumière le rôle essentiel de la protéine Tau dans l'établissement de la polarité neuronale. Des équipes ont ensuite cherché à raffiner les événements majeurs de la mise en place de la polarité neuronale, avant d'observer que lors du développement de l'axone, la densité de Tau la plus importante se situait au niveau du cône de croissance axonal (Kempf et al. 1996). Cette distribution tranche avec celle des MTs axonaux qui se situent majoritairement au niveau de la partie proximale de l'axone. La coordination entre la formation de l'axone et la concentration de protéine Tau au niveau du cône de croissance suggère donc un rôle de Tau dans la croissance axonale. En parallèle, une équipe a développé un modèle de souris « knock-out » (KO) pour Tau, à qui il manque le gène codant pour la protéine Tau (Harada et al. 1994). Si d'un point de vue immunohistologique le système nerveux semble normal et que l'élongation axonale de neurones mis en culture n'est pas altérée, l'équipe a remarqué qu'au niveau d'axones de plus petit calibre il y a une forte atteinte de la stabilité et de l'organisation des MTs. Le nombre de ponts entre les MTs est également affecté, soulignant l'importance de la protéine Tau dans la maturation axonale (ici, de petit calibre). Cette même étude (Harada et al. 1994) a également observé une augmentation en MAP1A (« microtubule-associated protein 1A »), qui pourrait peut être venir compenser le rôle de Tau au niveau des axones de plus gros calibre, ce qui expliquerait leur absence de défauts et leur bonne élongation axonale. L'investigation de cette possible compensation a été investiguée par d'autres équipes, avant de trouver qu'il existait en effet une redondance fonctionnelle entre la protéine Tau et MAP1 (MAP1B particulièrement) concernant la croissance axonale (DiTella et al. 1996; Takei et al. 2000). Quant au modèle de souris Tau-KO, une autre équipe a pu mettre en avant des atteintes neurologiques dues à l'absence de Tau chez des souris âgées, ainsi que des troubles du comportements et une faiblesse musculaire (Ikegami, Harada, and Hirokawa 2000).

Une seconde approche permettant de raffiner le rôle de la protéine Tau est de permettre son expression dans des modèles cellulaires qui ne la présente pas de façon endogène (Kanai et al. 1989; Knops et al. 1991; Kanai, Chen, and Hirokawa 1992). On a remarqué que l'expression de Tau dans des cellules non neuronales d'insecte (*Spodoptera frugiperda*, « Sf9 ») induisait la formation de très longues expansion cytoplasmiques au calibre uniforme et dont la morphologie ressemblait fort aux axones typiquement observés en culture neuronale

(Knops et al. 1991). Si l'apparition de ces expansions soutient le rôle de la protéine Tau dans la formation des neurites, la microscopie électronique a également révélé des faisceaux de MTs, orientés parallèlement aux expansions. Des transfections avec l'ADNc de Tau ont également été effectué dans des fibroblastes (Kanai et al. 1989), induisant des faisceaux épais de MTs comparables à ceux observés dans les cellules Sf9 (Knops et al. 1991). La transfection de Tau dans les fibroblastes a également entraîné une augmentation de la production de tubuline dans les cellules transfectées, ce qui laisse à penser que la protéine Tau induit la polymérisation de tubuline ainsi que la formation de faisceaux microtubulaires, plus particulièrement en présence des exons 2 et 3 dans la protéine Tau (Kanai, Chen, and Hirokawa 1992). Ceci soutient donc son rôle essentiel dans la maturation des neurones.

1.2.5.3. Liaisons aux MTs

Tau est une protéine d'association aux MTs (« microtubule-associated protein », MAP), ce qui signifie entre autres choses qu'elle a pour fonction de stabiliser le réseau microtubulaire et de promouvoir leur polymérisation (Connolly et al. 1977; Weingarten et al. 1975; Butner and Kirschner 1991). Les MTs sont composées de 13 protofilaments, constitués d'hétérodimères de tubuline (α et β) liés à une molécule de guanosine tri-phosphate (GTP) lors de leur assemblage (Hirokawa 1990; Kandel 2013). Ces 13 protofilaments s'organisent en feuillets, et ultimement forment une structure tubulaire de 25 à 28nm de diamètre, le MT, unité constituante du cytosquelette. Ici, nous vous présentons les deux points de liaison entre la Tau et les MTs : par l'intermédiaire du MTBD, et par l'intermédiaire du domaine de projection.

1.2.5.3.1. Via le MTBD

La liaison classique de la protéine Tau au réseau microtubulaire par l'intermédiaire du MTBD (Serrano et al. 1985) se fait sur la surface externe des protofilaments de tubuline, une fois les MTs assemblés (Al-Bassam et al. 2002). Toutefois, il arrive que cette liaison se fasse sur la surface interne des MTs, lorsque leur assemblage n'est pas encore complété (Kar et al. 2003). Si le MTBD s'étend des répétitions R1 à R4, sa région avec la plus grande affinité pour

les MTs se situe entre les répétitions R1 et R2 (Goode and Feinstein 1994; Drechsel et al. 1992). Cette région n'est présente qu'au niveau des isoformes 4R, ce qui explique la propension de ces isoformes à mieux lier et à promouvoir un meilleur assemblage des MTs (G. Lee, Neve, and Kosik 1989; M. Goedert and Jakes 1990).

1.2.5.3.2. Via le domaine de projection

La liaison de la protéine Tau aux MTs via son domaine de projection vient renforcer la liaison déjà établie via le MTBD, grâce à des interactions intramoléculaires entre le domaine enrichi en proline et le MTBD (Goode et al. 1997). Le domaine de projection de la protéine joue également un rôle structural clef, tout d'abord en déterminant l'espacement entre les MTs de l'axone (Chen et al. 1992; Leclerc et al. 1996), puis en liant les MTs adjacents les uns aux autres (Hirokawa, Shiomura, and Okabe 1988). Le rôle de liaison aux MTs via le domaine de projection de Tau est donc un rôle indirect, mais néanmoins nécessaire.

1.2.6. Tau en condition pathologique

1.2.6.1. Hyperphosphorylation

Les patients atteints de la MA ont la particularité de voir la Tau de leur cerveau fortement phosphorylée comparativement au niveau de phosphorylation observé chez les sujets sains (A. Alonso et al. 2001). Ceci peut être la conséquence soit d'une augmentation de la quantité de protéine Tau phosphorylée à un ou plusieurs épitope particulier, soit d'une augmentation globale de la phosphorylation de Tau (Köpke et al. 1993; Ksiezak-Reding, Liu, and Yen 1992). Un consensus a cependant été établi, selon lequel l'hyperphosphorylation de la protéine Tau serait le résultat d'un déséquilibre entre les kinases et les phosphatases régulatrices de la protéine, avec une diminution de l'activité des phosphatases et une augmentation de l'activité des kinases (J. Z. Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1996; Iqbal et al. 2002). Dans les années 90 et au début des années 2000, plusieurs études ont tenté d'identifier les kinases principalement responsables de l'hyperphosphorylation aberrante de Tau observé

dans la MA. Deux protéines kinases se liant aux MTs, la protéine kinase I et la protéine kinase II, ont été démontrées capables d'induire un changement de conformation de la protéine Tau (Ishiguro et al. 1992; Imahori and Uchida 1997). Ces protéines kinases ont par la suite été identifiées comme étant la GSK3 pour la protéine kinase I et la CDK5 pour la protéine kinase II (Ishiguro et al. 1993). Dans le cas de la kinase GSK3, il a été montré que sa phosphorylation de Tau pourrait être essentielle à la formation de polymères de Tau (M. Pérez et al. 2000; Mar Pérez et al. 2002), et par extension à l'agrégation de la protéine Tau (Jackson et al. 2002). Cependant, cette phosphorylation n'est pas effective seule et doit être précédée par des phosphorylations faites par d'autres kinases en amont (Singh et al. 1995). C'est l'étude de Li et Paudel qui a raffiné ces « pré-phosphorylations » comme ayant lieu au niveau des sérines 235 et 404 de la protéine Tau, et qui rendent la protéine plus accessible à la GSK3(β) pour phosphoryler la thréonine 231, et les sérines 396 et 400 (Li and Paudel 2006). La GSK3 peut cependant phosphoryler directement la sérine 202 de la protéine Tau.

L'hyperphosphorylation induite par la GSK3 en pathologie altère également l'affinité de Tau avec les MTs (Drechsel et al. 1992), et donc leur polymérisation ainsi que leur assemblage (Lindwall and Cole 1984; M. A. Utton et al. 1997). C'est donc tout le réseau microtubulaire qui s'en voit affecté (Ebner et al. 1999). C'est le cas de la sérine 396, la thréonine 231 mais aussi la sérine 262, dont la phosphorylation a un impact direct sur l'affinité de Tau avec les MTs (Biernat et al. 1993; Bramblett et al. 1993; Sengupta et al. 1998). Toutefois, en 2008 l'équipe du Dr Planel a mené une étude sur des souris sauvages et transgéniques, chez qui ils ont causé une hyperphosphorylation de Tau induite par l'hypothermie liée à l'anesthésie (Planel et al. 2008). Ils ont observé que la dissociation de Tau des MTs ne menait pas à la dépolymérisation attendue de la tubuline, et que le réseau microtubulaire ne semblait pas affecté. Ces résultats ne concernent cependant qu'une sous-population de protéine Tau, la Tau liée aux MTs, car les résultats concernant la Tau libre hyperphosphorylée indiquent bien qu'elle n'est pas capable de se lier aux MTs ou bien d'induire leur assemblage. De plus, en 2009, la même équipe a montré que l'hypothermie due à l'anesthésie induisait une augmentation du taux de Tau phosphorylée, mais aussi de la Tau insoluble et agrégée, ainsi qu'un détachement de Tau des MTs (Planel et al. 2009). Par la suite, c'est tout le réseau des MTs qui s'effondre, dérégulant également le transport axonal

(Trojanowski and Lee 1994; Mandelkow et al. 2003; S. C. Feinstein and Wilson 2005; Mi and Johnson 2006). D'un point de vue morphologique, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau se traduit par un changement de conformation de la protéine, qui se replie sur elle même pour former des fragments hélicaux pairés (PHF) (Jeganathan et al. 2008). En effet, la Tau hyperphosphorylée est plus résistante aux clivages par les protéases neuronales, ce qui mène à son accumulation, son agrégation ainsi qu'à sa relocalisation de l'axone vers le compartiment somatodendritique (Yang and Ksiezak-Reding 1995; Johnson 1992; Litersky and Johnson 1992; Litersky and Johnson 1995).

1.2.6.2. Agrégation

L'agrégation de la protéine Tau est le phénomène qui découle de son hyperphosphorylation (A. Alonso et al. 2001; S. Mondragón-Rodríguez et al. 2014). Cependant, la phosphorylation de certains acides aminés de la protéine va avoir tendance à promouvoir particulièrement son agrégation – c'est le cas des sérines 396, 404 et 422 (S. Mondragón-Rodríguez et al. 2014; C. Haase et al. 2004; Abraha et al. 2000). En effet, la partie Cterm de la protéine tend plutôt à inhiber son agrégation, toutefois les phénomènes de phosphorylation ciblant ces sérines en Cterm inverse cette tendance en induisant une propension à l'agrégation (C. Haase et al. 2004; Abraha et al. 2000). Nous avons donc vu que l'hyperphosphorylation de Tau induisait son détachement des MTs, puis la formation de PHF (Kidd 1963; Spillantini and Goedert 1998; A. Alonso et al. 2001). Ces PHF vont ensuite s'agréger pour former les NFTs, que l'on retrouve en intracellulaire dans le compartiment somatodendritique du à la relocalisation de la protéine Tau depuis l'axone (V. M. Lee, Goedert, and Trojanowski 2001).

Le phénomène d'agrégation est également augmenté de par les propriétés de recrutement des formes libres de Tau hyperphosphorylée. En effet en 1996 une étude a mis en évidence la capacité de la protéine Tau hyperphosphorylée à recruter des protéines Tau non phosphorylées pour former des agrégats, venant soutenir ce que l'on nomme la théorie « prion-like » dans le domaine de la MA (A. C. Alonso, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1996). De plus, des études ont prouvé l'accumulation des formes tronquées de Tau dans la MA, du fait

d'un déséquilibre entre la suppression et la formation des fragments protéolytiques de la protéine Tau (Chesser, Pritchard, and Johnson 2013). Cette accumulation participe également aux phénomènes d'agrégation de façon indirect, en augmentant la toxicité intraneuronale et en favorisant la formation de NFTs. Enfin, plusieurs études ont fait état du fait que ce serait la forme soluble libre hyperphosphorylée de Tau qui causerait la toxicité et non la forme insoluble retrouvée dans les NFTs (Chesser, Pritchard, and Johnson 2013), de quoi considérer l'agrégation comme neuroprotectrice plutôt que neurotoxique.

1.2.6.3. Propagation de la pathologie

La pathologie de Tau se suit anatomiquement en observant la séquence d'apparition des NFTs dans le cerveau des patients Alzheimer (Grundke-Iqbal et al. 1986). En effet, cette progression s'avère stéréotypée et elle débute profondément dans le cerveau, au niveau du cortex trans-entorhinal (H. Braak and Braak 1991; Heiko Braak et al. 2011), avant de se propager vers l'hippocampe et les régions corticales (figure 10). Cette progression suivant des voies neuroanatomiques, plusieurs équipes ont commencé à étudier une possible propagation dite de « cellule à cellule » (Clavaguera, Grueninger, and Tolnay 2014; de Calignon et al. 2012; Iba et al. 2013; Mohamed et al. 2013; Lasagna-Reeves et al. 2012). En effet, Lasagna-Reeves a montré que suite à une injection d'oligomères de Tau provenant de patients Alzheimer dans l'hippocampe de souris sauvage, on retrouve 11 mois après l'injection des agrégats de Tau dans l'hippocampe ainsi que dans le cortex et l'hypothalamus (régions adjacentes) (Lasagna-Reeves et al. 2012). Une des hypothèses concernant la propagation de cellule à cellule a vu le jour suite à l'observation de structures ressemblant à des nanotubes (Gousset et al. 2009), laissant envisager une possible propagation intercellulaire ne passant pas par le milieu extracellulaire. La seconde hypothèse privilégie quant à elle une propagation via le milieu extracellulaire, la Tau étant sécrétée *in vivo* par les neurones (Yamada et al. 2011) et une surexpression de Tau humaine dans des cellules non-neurales induisant une propagation de la pathologie de Tau de cellule à cellule (Kfoury et al. 2012) via la Tau extracellulaire. Comme le rapporte la revue de littérature publiée en 2013 par notre laboratoire, la propagation de la pathologie de Tau de cellule à cellule résulte principalement de la sécrétion de Tau par le

neurone pré-synaptique et par sa recapture par le neurone post-synaptique (Mohamed et al. 2013).

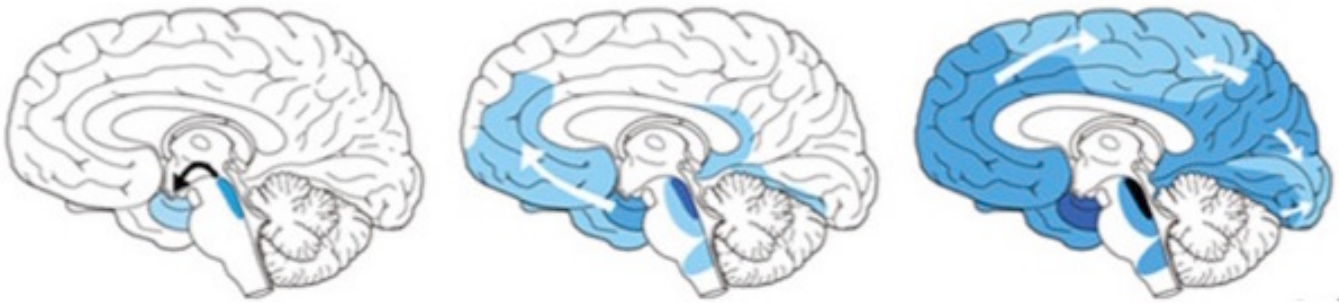


Figure 10. Progression de la pathologie de Tau à travers le cerveau

Modifié de (Jucker and Walker 2013)

1.2.7. Sécrétion de Tau

Pour rappel, la sécrétion permet aux protéines intracellulaires d'être transportées vers l'espace extracellulaire, comme par exemple la fente synaptique entre deux neurones. La protéine est alors soit sous une forme libre soit liée à la membrane plasmique de la cellule. La plupart des protéines sécrétées empruntent la voie de sécrétion dite conventionnelle. Cette voie de sécrétion concerne les protéines ayant un peptide signal qui adresse leur synthèse au réticulum endoplasmique (RE), avant d'être transportées vers l'AG grâce aux COPII (« coat protein complex II ») recouvrant les vésicules sortantes du RE puis l'espace extracellulaire (Farhan and Rabouille 2011; Oprins et al. 2001). La voie RE/AG est également régulé par les COPI (« coat protein complex I ») (Catherine Rabouille and Klumperman 2005), qui sont indirectement ciblées par la brefeldin A (BFA), une drogue qui bloque le transport RE/AG et donc interrompt la sécrétion conventionnelle. En amont, ce phénomène est initié par l'inhibition spécifique de l'interaction GTP-dépendante entre le facteur d'ADP-ribosylation 1 (ARF1) et les membranes du RE, par la BFA (Rambourg, Clermont, Jackson, et al. 1995).

En 2012, une étude de notre laboratoire (Plouffe et al. 2012) a permis de montrer que la sécrétion de Tau n'était pas altérée en présence de BFA, qui n'utilise donc pas la voie de sécrétion cellulaire conventionnelle, mais une/des voie(s) non-conventionnelle(s) ne nécessitant pas de peptide signal (Nickel and Rabouille 2009; Catherine Rabouille, Malhotra, and Nickel 2012). Ici, nous allons donc détailler les différentes voies de sécrétion non-conventionnelles possibles de la protéine Tau, en condition physiologique et en condition pathologique.

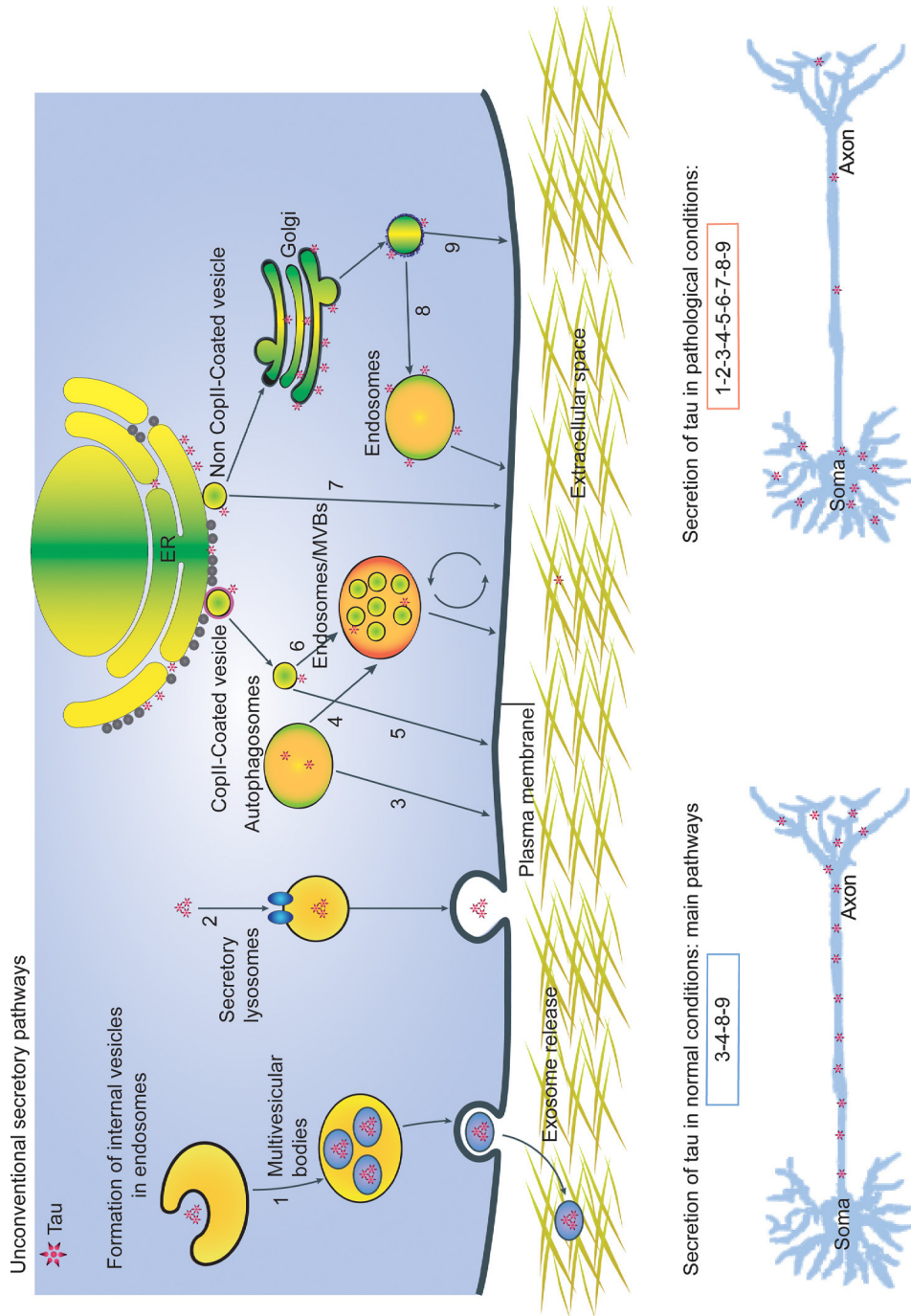


Figure 11. Schéma de sécrétion non-conventionnelle possible de la protéine Tau

Schéma de la revue de littérature de (Mohamed et al. 2013), modifié de (Nickel and Rabouille 2009)

1.2.7.1. En condition physiologique

En condition physiologique, Tau est enrichie dans l'axone. Tau pourrait alors être sécrétée par des autophagosomes qui se trouvent dans l'axone (Berg et al. 1998). La protéine Tau contenue à l'intérieur des autophagosomes serait alors libérée dans l'espace extracellulaire grâce à leur fusion avec la membrane plasmique (voie 3, figure 11). Une autre voie hypothétique de sécrétion de Tau pourrait faire intervenir la fusion des autophagosomes, soit avec des endosomes soit avec des corps multivésiculaires (« multivesicular bodies », MVBs) (Duran et al. 2010; Berg et al. 1998), avant d'ultimement fusionner avec la membrane plasmique (voie 4, figure 11). La sécrétion de Tau pourrait également se produire par deux voies de sécrétions qui feraient intervenir des vésicules issues du Golgi recouvertes de clathrine (voie 9, figure 11). Ces vésicules pourraient fusionner directement avec la membrane plasmique ou avec une structure endosomale avant de fusionner avec la membrane plasmique (voie 8, figure 11) (Ponnambalam 2003; Fatal, Suntio, and Makarow 2002).

1.2.7.2. En condition pathologique

En conditions pathologiques, Tau s'accumulant dans le compartiment somato-dendritique, ceci pourrait lui donner accès à d'autres voies non-conventionnelles de sécrétion qui impliquent des organelles enrichis dans ce compartiment tels que les vésicules qui se forment à la surface du RE, les lysosomes et les MVBs. Dans ce cas, Tau pourrait se retrouver à la surface de vésicules non-COPII qui fusionneraient directement avec la membrane plasmique pour la sécréter (voie 7, figure 11) (Fatal, Suntio, and Makarow 2002). Quant aux vésicules COPII, elles seraient capables soit de fusionner avec les endosomes ou les MVBs avant d'atteindre la membrane plasmique (voie 6, figure 11) (Yoo et al. 2002), soit de directement fusionner avec la membrane plasmique (voie 5, figure 11) (X. Wang et al. 2004). Pour ce qui est de la Tau sous forme libre, des organelles appelés lysosomes sécrétoires possédant les capacités des lysosomes et des granules sécrétoires pourraient l'endocyter avant de la sécréter dans l'espace extracellulaire (voie 2, figure 11), à la manière de l'interleukine 1 β (Andrei et al. 1999). Enfin, les MVBs ont été reconnu capables de transport de protéines (Von Bartheld and Altick 2011). La Tau libre pourrait donc être dans des vésicules endosomales

formant des MVBs, avant de fusionner avec la membrane plasmique provoquant une sécrétion dans l'espace extracellulaire d'exosomes contenant la protéine Tau (voie 1, figure 11) (Smalheiser 2007; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008).

1.3. L'appareil de Golgi

1.3.1. Découverte

Cet organelle a été décrit pour la première fois par le médecin et histologiste Italien Camillo Golgi en 1898, suite à son observation dans des cellules nerveuses d' « appareils réticulés internes » (Bentivoglio 1999). Camillo Golgi avait en effet optimisé dans les années précédentes une technique de coloration cytochimique au nitrate d'argent dans le cadre de ses études sur les cellules nerveuses comme celles de l'hippocampe et c'est grâce à cette technique qu'il a pu observer pour la première fois ce qui porte désormais le nom d'appareil de Golgi (AG) ou tout simplement de Golgi (Golgi 1989b; Golgi 1989a; Golgi, Bentivoglio, and Swanson 2001). Camillo Golgi reçu par la suite le Prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1906, l'AG étant le premier organelle cellulaire identifié grâce à l'histologie et la microscopie (Bentivoglio 1999).

1.3.2. Structure

On ne compte qu'un seul AG par cellule chez les mammifères, contre plusieurs AG de petites taille chez la plupart des cellules d'invertébrés et chez les levures (Preuss et al. 1992; Rambourg, Clermont, Ovtracht, et al. 1995). D'un point de vue structural, l'AG est constitué d'un empilement de saccules ou citernes plates de 15 à 20nm d'épaisseur, et séparées les unes des autres par environ 30nm (L. M. Prescott, Harley, and Klein 2003). Ces citernes, aux bouts desquelles bourgeonnent des vésicules, sont reliées entre elles par des extensions en formes de tube (extensions tubulaires), formant ainsi une sorte de ruban appelé ruban Golgien (Farquhar and Palade 1981; Rambourg and Clermont 1986; S. Wang et al. 2012). Les vésicules sphériques observées au voisinage des citernes semblent provenir d'une

fragmentation des extensions tubulaires reliant deux empilements entre eux, et sont présentes à la périphérie du Golgi (Marsh et al. 2001; Rambourg and Clermont 1986). Cette structure a été observée en histologie mais également dans des préparations de purification d'AG (Nakamura et al. 1995) et en microscopie électronique (Weidman, Roth, and Heuser 1993).

Pour le décrire, on peut séparer l'AG en quatre parties (figure 12). Si l'on suit une direction antérograde, c'est à dire du RE aux protéines matures, la première section du Golgi est appelée la région Cis, qui consiste en la région d'entrée des protéines en provenance du RE. La seconde région est nommée région médiane ou bien Golgi médian car elle est comprise entre les faces d'entrée et de sortie des protéines. Il y a ensuite la région appelée Trans, puis la dernière section de l'AG quant à elle appelée réseau trans-Golgien (« trans-Golgi network », TGN) et qui correspond au site de sortie des protéines matures (Clermont, Rambourg, and Hermo 1995). Autour de l'AG, des compartiments appelés compartiments intermédiaires ont également été décrits. Le premier est un compartiment qui représente la zone comprise entre le RE et l'AG, et il est appelé le compartiment intermédiaire RE/Golgi (« ER-Golgi intermediate compartment », ERGIC) (Saraste and Kuismanen 1984; Ben-Tekaya et al. 2005). Le second compartiment est appelé compartiment de transport tubulo-vésiculaire (« vesicular tubular cluster », VTC) et fait référence aux vésicules présentes avant le Golgi, enrichies en protéines COPI (Martínez-Menárguez et al. 1999).

Quant à l'emplacement de l'AG dans la cellule, dès ses premières descriptions Camillo Golgi avait observé que l'AG avait une localisation périnucléaire (Bentivoglio 1999). Des études ont par la suite décrit des interactions existant entre certaines kinésines et dynéines avec le ruban Golgien, induisant une position de l'AG dans la cellule proche du centre d'organisation des MTs, à savoir le centrosome (Xu et al. 2002; Burkhardt et al. 1997) et expliquant la dispersion Golgienne observée en cas de désassemblage des MTs (Cole et al. 1996; Thyberg and Moskalewski 1999). La localisation de l'AG fait donc de lui un organelle central de la cellule.

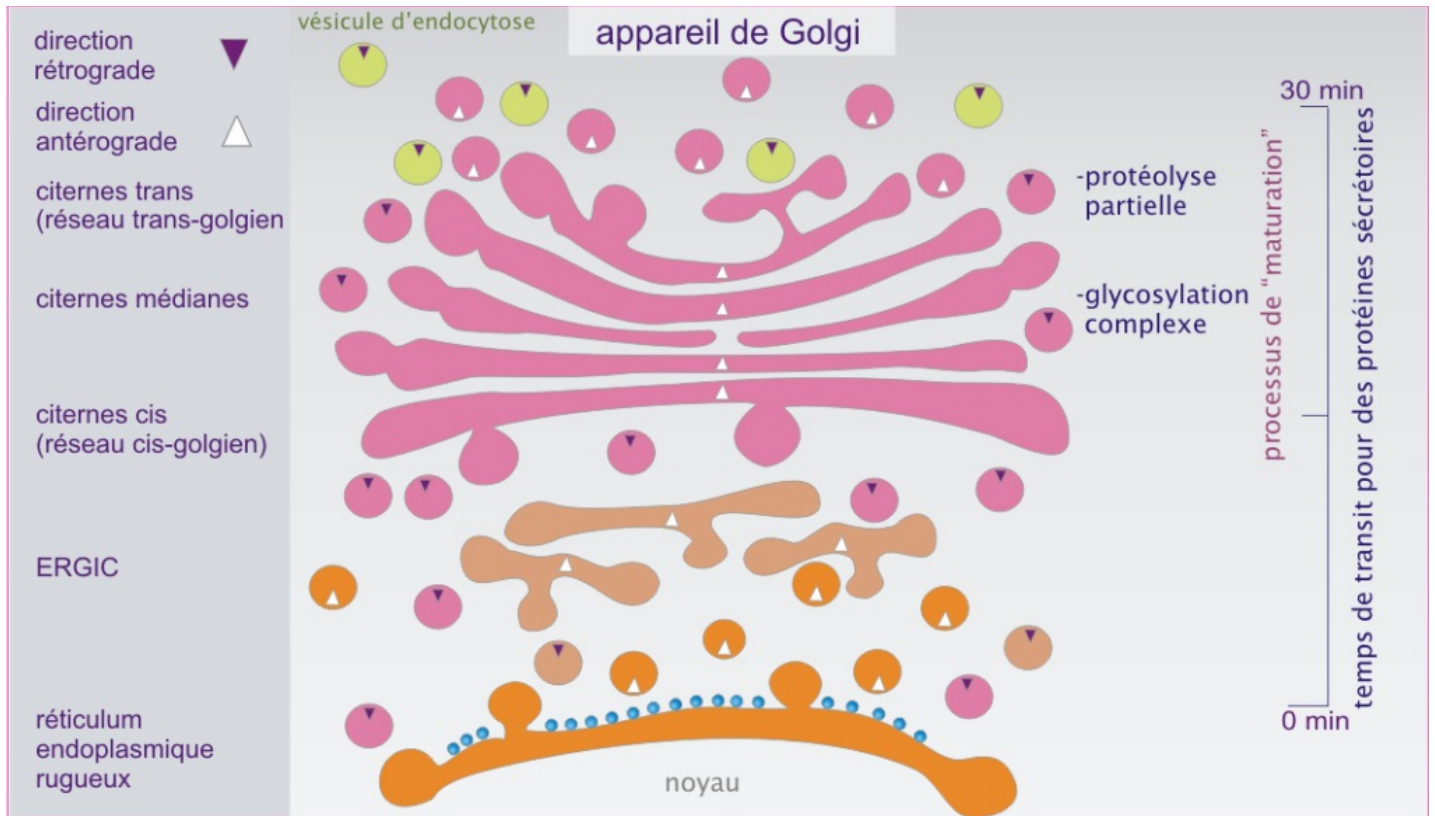


Figure 12. Schéma de la structure de l'appareil de Golgi

Schéma provenant du site de l'UFR de Sciences Biologiques, Université Bordeaux 1, France.

1.3.3. Fonctions

1.3.3.1. Maturation des protéines synthétisées dans le RE

À leur sortie du RE, les protéines ne sont pas encore complètement fonctionnelles. Elles doivent passer par un processus de maturation, via leur transit à travers l'AG – à leur sortie, elles sont alors caractérisées de « matures ». Cependant, seules les protéines correctement repliées subissent ce processus, les autres étant retenues par le RE grâce à des protéines chaperonnes (Nehls et al. 2000). Ce processus de maturation implique différentes modifications post-traductionnelles essentielles pour le bon fonctionnement des protéines.

Ces modifications ont lieu à des endroits précis de l'AG, les enzymes responsables ayant une localisation définie le long du transport de la protéine à travers le Golgi (de la face Cis à la face Trans). En effet, en 1995 une étude menée dans les cellules HeLa a établi une cartographie des enzymes Golgiennes responsables de processus de glycosylation et de la formation progressive d'oligosaccharides (figure 13) (C. Rabouille et al. 1995), confirmant les travaux précédents (R. Kornfeld and Kornfeld 1976; R. Kornfeld and Kornfeld 1985). Cette étude a permis de localiser précisément les enzymes NAGT I (N-acétylglucosaminyltransférase I) et Mann II (α -1,3-1,6 mannosidase II) au niveau du Golgi médian et des citernes Trans, les enzymes GalT (β -1,4 galactosyltransférase) et SialylT (α -2,6 sialyltransférase) étant présentes au niveau des citernes Trans et du TGN (C. Rabouille et al. 1995). Ceci permet également d'établir un ordre des modifications menant à la maturation des protéines, les enzymes présentent au niveau du TGN apportant les modifications les plus tardives dans le parcours protéique à travers le Golgi (sens antérograde).

La glycosylation est la modification post-traductionnelle la plus courante pour les protéines (Stanley 2011) notamment dans le Golgi, et elle a été caractérisée précisément par plusieurs études (Farquhar and Palade 1981; Rothman 1994; Traub and Kornfeld 1997; S. Kornfeld 1992; Le Borgne and Hoflack 1998). Cependant, si la N-glycosylation s'effectue principalement au niveau du RE, c'est bien le Golgi qui est responsable des derniers ajouts de sucres par O-glycosylation sur les protéines (Rothman 1994). En effet, l'AG contient de nombreuses glycosyl-transférases et glycosydases qui ensemble permettent de raffiner la glycosylation (Stanley 2011). Plusieurs de ces glycosyl-transférases sont par ailleurs clivées

par les nombreuses protéases également présentes dans le Golgi (Varki 1998) et sont ensuite sécrétées (Shifley and Cole 2008; Kitazume et al. 2009).

Les modifications post-traductionnelles subies dans l'AG par les protéines sont cependant parfois dépendantes des modifications ayant eues lieu dans le RE. C'est le cas des modifications des chaînes de sucre portées par les glycoprotéines, qui concernent uniquement les chaînes modifiées préalablement par N-glycosylation dans le RE. C'est ce qui se passe par exemple pour la phosphorylation des mannoses – cette phosphorylation a lieu dans l'AG après une N-glycosylation dans le RE (Traub and Kornfeld 1997). Ce phénomène a par ailleurs la particularité d'adresser les protéines ainsi modifiées aux lysosomes. Les protéines sont incorporées dans des vésicules qui bourgeonnent du TGN avant de se diriger vers leur destination finale, les lysosomes (S. Kornfeld 1992; Le Borgne and Hoflack 1998; Traub and Kornfeld 1997).

Il existe d'autres modifications post-traductionnelles qui affectent les protéines dans le Golgi. C'est le cas de la sulfatation (Farquhar and Palade 1981) qui concerne principalement les protéines sécrétées. Le donneur de sulfate impliqué dans la sulfatation Golgienne est le PAPS (phospho-adenosine phospho-sulfate) qui est synthétisé dans le cytosol de la cellule puis amené jusqu'au Golgi par un transporteur (Dowood et al. 2016). C'est également au niveau de l'AG que se fait l'ajout de lipides sur certaines protéines, principalement des protéines membranaires. Ce processus implique l'addition d'une ancre GPI (glycosylphosphatidyl inositol) sur les protéines via l'intervention de la phosphoéthanolamine (Benting, Rietveld, and Simons 1999; Fivaz et al. 2002; Sotgia et al. 2002; Sharma et al. 2004). C'est grâce à cette ancre GPI que les protéines pourront ultérieurement s'associer à des radeaux lipidiques (Alfalah et al. 1999; Paladino et al. 2004). Enfin, on observe également des phénomènes d'oxydation, de phosphorylation, la formation de ponts disulfures ou encore des clivages pendant le transport des protéines à travers le Golgi (Myllyharju and Kivirikko 2004; Hsu et al. 2016). Suite à toutes ces modifications, elles peuvent enfin être qualifiées de « matures ».

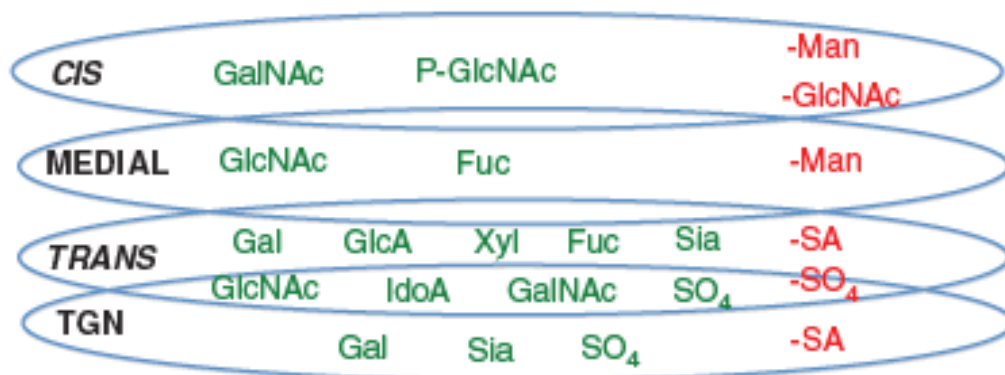


Figure 13. Schéma d'addition ou de suppression des sucres à travers le Golgi

Issu de (Stanley 2011) à partir de (C. Rabouille et al. 1995). En vert : ajout de sucre, en rouge : suppression de sucre.

1.3.3.2. Endocytose et sécrétion

Les exemples précédemment évoqués de maturation protéique dans le sens antérograde de l'AG illustrent ce que l'on appelle la voie de biosynthèse-sécrétion qui existe entre le RE jusqu'à la sortie du Golgi. Cette voie engendre un flux de membranes important, qui trouve son équilibre avec l'existence d'une voie rétrograde de transport, qui fait appel au processus d'endocytose. Cette voie passe le plus souvent par des endosomes ou endosomes tardifs. Ce sont eux qui recyclent par exemple le récepteur au mannose-6-phosphate (S. Kornfeld 1992), grâce à Rab9, une petite GTPase, à α -SNAP (« soluble NSF attachment protein »), acteur de la régulation SNARE (« SNAP receptor »), ainsi qu'à la protéine TIP47 (Lombardi et al. 1993; Itin et al. 1997; Carroll et al. 2001; Frédéric Mallard et al. 2002). La voie de transport rétrograde peut aussi se passer des endosomes tardifs, comme le montre une étude de 1998 menée sur la toxine Shiga, produite par la bactérie *Shigella dysenteriae* (F. Mallard et al. 1998). L'étude rapporte que la sous-unité B de cette toxine est capable d'atteindre directement le TGN sans avoir à passer par les endosomes tardifs, mais en utilisant les endosomes dits précoces que l'on retrouve le plus souvent côté Cis. Cette observation vient confirmer l'existence d'une voie entre les endosomes précoces et le TGN, qui avait été évoquée pour la

première fois suite à l'observation de transferrine, un marqueur des endosomes précoces, dans le TGN (Fishman and Fine 1987; Stoorvogel et al. 1988).

C'est d'ailleurs l'étude de Stoorvogel en 1988 qui fait le lien entre le cheminement des protéines sécrétées par le Golgi et le processus d'endocytose, les deux processus étant liés au niveau du TGN (Stoorvogel et al. 1988). En utilisant un conjugué de transferrine et de HRP (« horseradish peroxidase ») visualisé par cytochimie, l'équipe a non seulement pu décrire l'endocytose des endosomes précoces porteur de transferrine, mais également la présence dans des mêmes vésicules du TGN de transferrine/HRP mais également d'albumine, qui elle emprunte la voie classique de transport antérograde des molécules sécrétoires. Les fonctions d'endocytose et de sécrétion assurées par l'AG sont donc fortement liées, parfois même au sein d'une même vésicule.

1.3.3.3. Autres fonctions

L'AG est le siège de nombreuses voies de signalisation cellulaires. En 2005, une étude a mis en évidence la contribution du Golgi dans la voie de la protéine kinase ERK (1 et 2), qui appartient à la famille des MAP kinases (Kondoh, Torii, and Nishida 2005). Si suite à un stimulus extracellulaire, la protéine ERK cytoplasmique est relocalisée au noyau, le fait que ERK soit bien fonctionnelle dans le cytoplasme en conditions normales est dû à la protéine transmembranaire Sef, qui a pour rôle de réguler la distribution de ERK dans la cellule en se liant à l'activateur spécifique de ERK, MEK (Kondoh, Torii, and Nishida 2005). Cette liaison a pour conséquence la relocalisation du complexe ERK/MEK au Golgi. De cette façon, la protéine Sef assure une signalisation de ERK dans le cytoplasme en bloquant la signalisation nucléaire. Un autre exemple de l'implication de l'AG dans la signalisation cellulaire est l'implication de la GTPase ARF dans la dynamique du Golgi. En effet, il existe un squelette de protéine spectrine (De Matteis and Morrow 1998) qui est associé avec différents organelles et qui est essentiel au bon maintien de la structure de l'AG ainsi que de la bonne marche du transport protéique à travers les endosomes précoces (J. D. Black et al. 1988). C'est la GTPase ARF qui régule l'assemblage de ce squelette de spectrine (De Matteis and Morrow 2000), notamment en contrôlant la composition des membranes Golgiennes.

Le Golgi est également un point de contrôle dans l'adressage des protéines (Lewin and Sanlavielle 1999). Par le biais de certaines modifications post-traductionnelles, il peut par exemple adresser certaines protéines à un compartiment cellulaire précis, comme par exemple les lysosomes (Traub and Kornfeld 1997). L'AG agit donc comme un centre de tri pour les protéines qui peuvent être recyclées par endocytose, adressées aux lysosomes, ou encore à la membrane plasmique pour être sécrétées (Lewin and Sanlavielle 1999).

1.3.4. Fragmentation de l'appareil de Golgi

1.3.4.1. En condition physiologique

À l'exception de phénomènes liés au cycle cellulaire comme la mitose (Corda et al. 2012; Posakony, England, and Attardi 1977; Colanzi and Sütterlin 2013; Misteli 1996; Ramirez and Lowe 2009), l'AG possède une forme compacte et non fragmentée en condition physiologique, bien que ce soit un organelle très dynamique de par ses échanges et mouvements de membranes ainsi que de vésicules. Cette morphologie compacte a été pour la première fois observée dans les années 50 par microscopie électronique, et traduit l'empilement des citernes empilées les unes contre les autres (Dalton and Felix 1954; Farquhar and Rinehart 1954; Sjostrand and Hanzon 1954; Dalton and Felix 1956).

Cependant, et même en conditions physiologiques, le volume de l'AG est sous l'influence du niveau de synthèse protéique (Klumperman 2011). Plusieurs études ont décrit que l'augmentation du niveau de synthèse en protéines entraînait une augmentation du volume de l'AG (Clermont et al. 1993; Noske et al. 2008), et qu'une inhibition des échanges protéiques entre le RE et l'AG pouvait mener à une forte réduction du volume Golgien jusqu'à sa disparition (T. H. Lee and Linstedt 1999; B. S. Glick 2000; Morin-Ganet et al. 2000; A. R. Prescott et al. 2001). De plus, la morphologie de l'AG est également dépendante du type cellulaire, des cellules comme les leucocytes ou les cellules plasmatiques ayant un Golgi plutôt sphérique et très compact, le Golgi des cellules de Sertoli ayant une surface plus importante (Rambourg 1997).

Physiologiquement, il existe pourtant une zone de l'AG qui est décrite comme une zone non compacte (Klumperman 2011). Il s'agit d'une zone périphérique aux citernes Golgiennes, et qui présente un réseau de tubules d'une trentaine de nanomètres de diamètre. Ce réseau a été détaillé par différentes équipes (Rambourg 1997; Benjamin S. Glick and Nakano 2009; Ladinsky et al. 1999) qui ont observé que certaines des tubulations le constituant revenait fusionner avec la citerne dont elles émergeaient, que d'autres émanant de la région Cis du Golgi se projetaient jusqu'aux VTCs, alors que des tubulations se contentaient de faire des projections latérales. Si le rôle de ce réseau n'est pas encore défini, il constitue néanmoins la région la moins compacte de l'AG en condition physiologique.

1.3.4.2. En condition pathologique

La fragmentation de l'AG est caractérisée par une discontinuité du ruban Golgien, avec la présence de citernes, tubules et vésicules isolées, accompagné d'une altération de l'intégrité des membranes Golgiennes (Catherine Rabouille and Haase 2015). Le Golgi compacte traditionnellement observé en condition physiologique laisse alors place à un aspect beaucoup plus épars, avec plusieurs fragments. En effet, la fragmentation de l'AG est une marque caractéristique de la plupart des maladies neurodégénératives comme Parkinson (Rendón et al. 2013; Coune et al. 2011), Huntington, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Gonatas et al. 1992; Atkin et al. 2014), Alzheimer (Joshi, Bekier, and Wang 2015; Baloyannis 2014) et les maladies à prion (Fan et al. 2008).

La première neuropathologie dans laquelle a été décrite une fragmentation de l'AG est la SLA au début des années 90 (Mourelatos et al. 1990; Gonatas et al. 1992; Fujita et al. 2002). Chez ces patients, 30% des neurones moteurs (neurones affectés par la SLA) présentent une fragmentation Golgienne en phase pré-clinique contrairement à 1% des neurones moteurs chez des sujets sains (Gonatas et al. 1992). Ces résultats chez l'humain concordent avec ceux observés chez les modèles animaux utilisés lors de ces études (Mourelatos et al. 1990; Mourelatos et al. 1996). La SLA familiale est caractérisée par une superoxyde dismutase (SOD1) mal repliée qui a été montré responsable de l'inhibition des échanges entre le RE et

l'AG, de stress au niveau du RE, ainsi que de la fragmentation Golgienne caractéristique de la maladie (Atkin et al. 2014).

Cependant, diverses hypothèses existent concernant la cause de la fragmentation Golgienne dans les neuropathologies, ainsi que la place de ce phénomène entre cause et conséquence. On identifie 3 propositions principales quand à l'origine de la fragmentation de l'AG, lesquelles ne sont pas mutuellement exclusives. La première hypothèse concerne les stress cellulaires, nombreux lors des maladies neurodégénératives (Bhat et al. 2015). Selon cette proposition, l'AG ne serait pas un simple receveur de stress cellulaire, mais un modulateur de la réponse au stress, ayant la capacité de l'amplifier, de réguler la réponse à ce stress, et ainsi de possiblement induire la neurodégénération (Alvarez-Miranda, Sinnl, and Farhan 2015). Cependant à ce jour, les études menées à ce sujet ont toutes été faites sur des cellules en culture, majoritairement des cellules non neuronales (de type HeLa), et sous contrôle des stress cellulaires appliqués (souvent stress oxydatif, stress osmotique). L'implication de l'AG dans la réponse au stress cellulaire dans un contexte de maladie neurodégénérative n'est donc pas encore résolue. La seconde hypothèse sur l'origine de la fragmentation Golgienne en pathologie s'oriente autour du transport vésiculaire de l'AG. En effet, on sait que les GTPases Rab et les SNAREs jouent un rôle essentiel dans la machinerie de transport de vésicules Golgiennes (Bonifacino and Glick 2004). Il existe un complexe protéique à 8 sous-unités appelé le COG (« conserved oligomeric Golgi ») qui a pour fonction d'organiser l'attachement des vésicules à la membrane du Golgi (Lupashin and Ungar 2008) et qui interagit avec de nombreuses GTPases Rab et SNAREs notamment lors de maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (Climer, Dobretsov, and Lupashin 2015). Des défauts au niveau des sous-unités de ce complexe ont été mis en relation avec une fragmentation Golgienne dans un contexte de CDG (« congenital disorders of glycosylation »), une maladie neurologique liée à des mutations ou délétions de sous-unités COG (Wu et al. 2004). Les défauts dans le complexe COG induisent donc des problèmes dans la biogénèse des vésicules, mais également dans leur transport vers et à travers le Golgi, ce qui aboutit à la fragmentation de l'AG. Cet exemple illustre comment un défaut au niveau de la formation et de la dynamique des vésicules Golgiennes peut avoir une incidence sur la morphologie de l'AG. La troisième hypothèse sur la fragmentation du Golgi est née de l'étude des MTs dérivées de l'AG dans la

SLA (G. Haase and Rabouille 2015). En effet, en plus de sa proximité géographique avec le centrosome, le Golgi est un lieu important de formation et d'organisation de MTs (Chabin-Brion et al. 2001). Un modèle animal de souris « pmn » (« progressive motor neuronopathy ») a été mis au point (Bellouze et al. 2014) qui a pour caractéristique l'absence du cofacteur E de liaison à la tubuline localisé au Golgi (TBCE, « tubulin-binding cofactor E »), et l'observation des neurones moteurs de ces souris a révélé une fragmentation importante de leurs AG dû aux défauts des MTs spécifiques au modèle animal. Ceci fait écho aux études montrant que l'altération des phénomènes de dépolymérisation au niveau des MTs entraîne bien une fragmentation du Golgi (Turner and Tartakoff 1989; Cole et al. 1996), la stabilité et l'intégrité des MTs semblant essentielles au maintien physiologique de la morphologie du Golgi.

1.3.4.3. Altérations de la fonction Golgienne

Si un Golgi fragmenté peut assurer des fonctions de maturation protéique et de sécrétion (Joshi et al. 2014), il arrive que ses transports antérogrades et rétrogrades soient affectés par la fragmentation.

1.3.4.3.1. Transport antérograde

Le transport antérograde est fortement affecté par la fragmentation Golgienne, et ce dans plusieurs maladies neurodégénératives. Dans la maladie de Parkinson, suite à la fragmentation de l'AG on observe par exemple un blocage du transport RE-Golgi (Cooper 2006) mais également une déplétion de LRRK2 (« leucine-rich repeat kinase 2 ») qui agit comme modulateur des sites de sortie du RE (Cho et al. 2014). Chez les patients SLA, des études ont montré que les mutants G93A et G85R de SOD1 observés dans les cas familiaux causaient une interruption du cheminement des protéines sécrétées et que l'interruption du transport RE-Golgi observé suite à la fragmentation Golgienne était dépendante de Rab1 (Anna Stieber et al. 2004; Soo et al. 2015). Toutefois, suite à une fragmentation Golgienne on peut également observer une accélération du transport protéique comme c'est le cas dans la MA (Y. Wang et al. 2008; Xiang et al. 2013).

1.3.4.3.2. *Transport rétrograde*

La fragmentation de l'AG impact également le transport rétrograde. C'est le cas par exemple dans la maladie de Huntington, où la protéine Huntingtine mutée (avec répétitions CAG surnuméraires) entraîne une déstabilisation des MTs et une fragmentation des Golgi. Ceci engendre une altération du transport rétrograde des vésicules Golgiennes (Caviston et al. 2007; Pardo et al. 2010) habituellement assuré par la dynéine. Malgré des mécanismes différents en fonction de la pathologie, les conséquences de la fragmentation de l'appareil de Golgi aboutissent la plupart du temps à une altération des transports antérogrades et rétrogrades.

1.3.4.4. **A β et le Golgi**

En 2014, une étude réalisée sur des souris transgéniques dites APP^{swe}/PS1 Δ 9 c'est à dire portant la mutation APP suédoise KM 593/594 NL ainsi qu'une mutation de la PS1 humaine (délétion de l'exon 9) s'est penchée sur l'aspect morphologique des AG de ce modèle animal (Joshi et al. 2014). Ils ont observé que dans le cerveau des souris, ainsi que les cellules en culture APP^{swe}/PS1 Δ 9 environ 70% des cellules présentaient un Golgi fragmenté. Cette fragmentation est également observée après ajout de peptide A β sur des neurones hippocampaux en culture, ainsi que chez les patients Alzheimer (A. Stieber, Mourelatos, and Gonatas 1996). L'équipe de Joshi a par le passé également démontré que la fragmentation de l'AG causait une accélération du transport protéique à travers le Golgi, mais également augmentation du bourgeonnement vésiculaire au niveau des membranes Golgiennes (Y. Wang et al. 2008; Xiang et al. 2013). Seulement, cette accélération de transport concerne également l'APP qui est synthétisée au RE avant d'être envoyé vers la membrane plasmique en passant par le Golgi, qui est fonctionnel malgré sa fragmentation (Thinakaran et al. 1996; Dries and Yu 2008; Choy, Cheng, and Schekman 2012; Prabhu et al. 2012). Dans ce cas, cette accélération se traduit par une augmentation de production du peptide A β , les sécrétases nécessaires à sa formation étant également produites et fonctionnelles en cas de Golgi fragmenté (Dries and Yu 2008).

Diverses études ont démontré que la déplétion de protéines Golgiennes matricielles comme GRASP55 (T. N. Feinstein and Linstedt 2008), GRASP65 (Xiang and Wang 2011; Xiang et al. 2013), GM130 (Puthenveedu et al. 2006; Sun et al. 2008), golgin-84 (Diao et al. 2003) ou encore golgin-160 (Williams et al. 2006) causait la fragmentation de l'AG. En 2008, une kinase a été désigné responsable de la phosphorylation de la protéine matricielle GM130, causant une fragmentation de l'AG (Sun et al. 2008). Cette kinase, CDK5, s'est avérée activée lors de l'addition de peptide A β synthétique dans le milieu d'une culture cellulaire.

L'étude de Joshi en 2014 s'est donc intéressée à cette kinase dans le modèle animal murin APP^{swe}/PS1 Δ 9 et ils ont découvert une activation de CDK5 qui phosphoryle fortement la protéine matricielle GRASP65, dont le rôle principal est d'assurer l'intégrité des citernes Golgiennes entre elles ainsi que le bon maintien de la structure en ruban (Joshi et al. 2014). Cette phosphorylation engendre donc la fragmentation de l'AG observée dans ce modèle animal. Ceci a été confirmé par inhibition de CDK5 ou encore par l'expression de mutants GRASP65 non phosphorylables qui permet de retrouver un Golgi compact. De plus, l'étude a identifié que l'activation de CDK5 est due à une accumulation de peptide A β , elle même causée par une accélération du transport protéique due à la fragmentation Golgienne. Ceci amène donc au cercle vicieux où le peptide A β induit la fragmentation de l'AG, ce qui augmente sa propre production (figure 14) (Joshi et al. 2014; Joshi and Wang 2015; Joshi, Bekier, and Wang 2015).

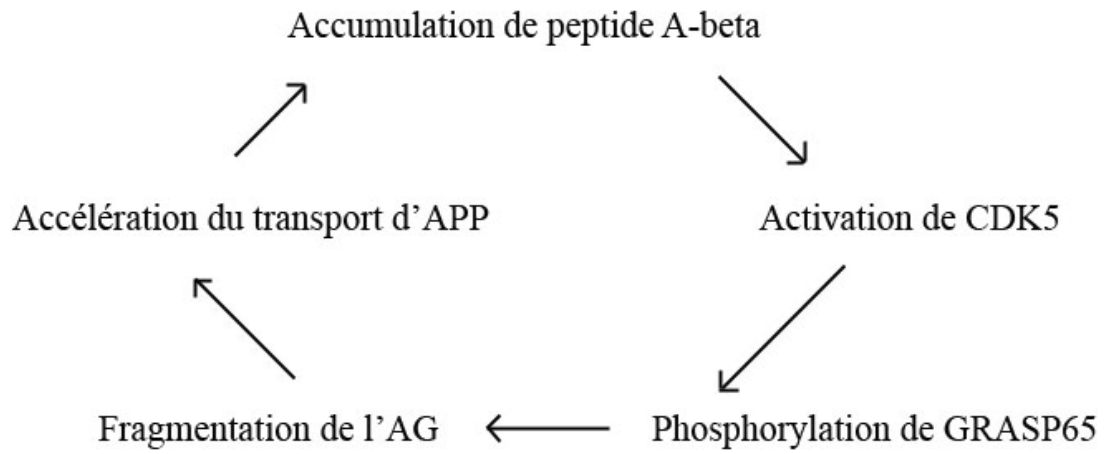


Figure 14. Représentation schématique du cercle vicieux entre A β et la fragmentation de l'AG dans la MA

1.4. Objectifs de l'étude

Si la fragmentation de l'AG est bien caractérisée lorsqu'elle est due au peptide A β et à la déstabilisation des protéines matricielles Golgiennes (Sun et al. 2008; Xiang et al. 2013; Y. Wang and Seemann 2011; Choy, Cheng, and Schekman 2012; Prabhu et al. 2012; Joshi et al. 2014; Joshi and Wang 2015; Joshi, Bekier, and Wang 2015), on en sait moins quand au possible lien entre la pathologie de Tau et la fragmentation du Golgi. En 2005, notre laboratoire a publié une étude faite sur des cultures primaires de neurones hippocampaux de rats mais aussi sur des souris JNPL3 exprimant la forme mutant de Tau P301L (Liazoghli et al. 2005). L'étude portait sur l'effet que la surexpression de la Tau humaine T4R (avec étiquette GFP) peut apporter à la morphologie de l'AG des neurones en culture et *in vivo* dans le modèle murin. Les résultats de culture primaire indiquaient que la surexpression de GFP-T4R dans les neurones hippocampaux induit une fragmentation plus importante que celle due à la transfection témoin de l'étiquette GFP seule, 31% des cellules transfectées Tau4R-GFP ayant un Golgi à l'aspect fragmenté contre 6,5% des cellules transfectées avec GFP. Les neurones transfectés avec des mutants pro-agrégatoires de Tau comme P301L, R406W ou V337M sont eux entre 39 et 43% à présenter un AG fragmenté. Concernant le modèle animal, les neurones moteurs des souris JNPL3 exprimant la Tau P301L présentaient également des AG plus fragmentés comparativement aux souris témoins, notamment chez les souris âgées (figure supplémentaire 1). De plus, cette fragmentation se trouve accrue dans les neurones qui présentent des agrégats de Tau hyperphosphorylée. Toutefois, une étude récente a pour la première fois établie un lien entre les altérations morphologiques Golgiennes des neurones des patients Alzheimer avec l'hyperphosphorylation de la Tau intracellulaire (Antón-Fernández et al. 2017). Nous avons donc tout d'abord cherché à examiner ce lien entre l'hyperphosphorylation de Tau et la fragmentation Golgienne *in vitro*, dans un système avec des formes de Tau mimant l'hyperphosphorylation mais non-phosphorylables afin d'étudier la morphologie du Golgi dans un tel système. Nous nous sommes ensuite intéressé aux mécanismes liant la fragmentation de l'AG à la Tau. La propagation de la pathologie de Tau se faisant notamment par un mécanisme de transmission de cellule à cellule (Mohamed et al. 2013), nous avons voulu savoir si la Tau extracellulaire avait la capacité d'induire une fragmentation Golgienne, ou bien si cette fragmentation était plutôt due à la Tau

intracellulaire. Enfin, nous nous sommes demandé si l'AG restait fonctionnel malgré les différents épisodes de fragmentation que nous avons observé.

2. Matériel et Méthode

2.1. Culture cellulaire

Les cellules HeLa (ATCC, USA) ont été cultivées dans du milieu EMEM (ATCC 30-2003) qui contenait 2mM de L-Glutamine, 1 mM de sodium pyruvate et 1500 mg/L de sodium bicarbonate, auquel a été ajouté 10% de sérum bovin fœtal (FBS HyClone, Logan, UT).

Pour les différentes transfections, les cellules étaient maintenues dans un incubateur avec 5% de CO₂ à 37°C et elles étaientensemencées à une densité de 220 000 cellules par pétris de 35mm de diamètre (P35) (Falcon, 353034). Pour la microscopie, on a déposé entre 2 et 3 lamelles de 15mm de diamètre par P35 (Fisherbrand, Microscope cover glass, 12-545-83).

2.2. Plasmides

Le plasmide de base qui a été utilisé était l'isoforme humaine adulte 0N4R de Tau, à 4 répétitions (4R). Cette isoforme a été liée en N-terminal à GFP dans le plasmide pEGFP-C1 pour donner ce que l'on appelle GFP-T4R. Le laboratoire a généré des mutants de Tau, dont le mutant dit E12 qui comporte 12 mutations glutamate qui miment l'hyperphosphorylation et le mutant dit A12 à 12 mutations alanine mimant l'hypophosphorylation, les 12 sites en question étant le plus fréquemment hyperphosphorylés dans la MA. La GFP a également été fusionnée à ces mutants pour donner au final des mutants GFP-E12 et GFP-A12.

Ont également été utilisés les plasmides GFP-Nt et GFP-Ct, qui correspondent, respectivement, aux domaines N-terminal et C-terminal de Tau, insérés dans le vecteur pEGFP-C1. Pour les expériences avec RFP-VSVG, on a utilisé le vecteur pEGFP-VSVG (Addgene, USA, 11912) qui comporte une mutation de la GFP.

2.3. Transfection

Les transfections ont eu lieu 24 heures après la mise en culture des cellules HeLa, avec les différents plasmides utilisés en fonction des expériences (GFP-Tau4R, GFP-E12, GFP-A12, GFP, GFP-Nt, GFP-Ct, RFP-VSVG) avec comme agent de transfection le « GeneJuice » (GJ) (Cedarlane, O8001-1G). Pour les transfections dans des pétris de 35mm (P35), on a utilisé les calculs suivant (pour 1 condition) :

$$[(100\mu\text{L Opti-Mem} + 3\mu\text{L GJ})_{5\text{min}} + 1\mu\text{g ADN}]_{10\text{min}}$$

À savoir que pour les expériences dont le temps post-transfection (« time-point », TP) était de 48h, le ratio de GJ était de 1/2 et non 1/3 comme indiqué par la formule ci-dessus. Il s'est avéré que pour des TP inférieurs à 48h on avait besoin de plus d'agent de transfection. Quant aux temps d'incubation, ils étaient de 5 minutes pour le mélange Opti-Mem (Life Technologies, USA, 31985-070) et GJ, puis de 10 minutes pour le mélange Opti-Mem, GJ et ADN. Suite à l'application de ce mélange sur les cellules, nous avons attendu 4 heures avant de remplacer le milieu par un mélange EMEM+FBS 10% stérile chauffé à 37°C. Différents TP ont été adoptés, et c'est pourquoi on trouvera le TP indiqué sur les figures de résultat.

2.4. Immunoprécipitation pour enlever la Tau du milieu de culture

À J0, ont été ensemencés 2 P100 avec 750 000 cellules par P100. À J1, on a transfecté un des P100 avec le plasmide GFP-E12, et on a changé le milieu 4 heures plus tard. À J3, nous avons récupéré le milieu du P100 transfecté GFP-E12 ainsi que 2mL de milieu du P100 non transfecté qui correspond au contrôle négatif. On a prélevé un échantillon de milieu GFP-E12 de 40µL (pour analyse ultérieure par immunobuvardage (IB)). Dans des tubes stériles, 2mL de milieu qui contenait GFP-E12 ont été incubé avec une résine contrôle (résine magnétique agarose, bmab-20, Chromotech, Allemagne) ou la résine GFP-trap (résine GFP-Trap-MA, gtma-20, Chromotech, Allemagne).

Nous avons donc 4 tubes stériles de 2ml avec :

- Tube 1 : milieu sans transfection (contrôle négatif, sans IP)
- Tube 2 : milieu GFP-E12 (contrôle positif, sans IP)
- Tube 3 : milieu GFP-E12 (avec résine contrôle)
- Tube 4 : milieu GFP-E12 (avec résine GFP-trap)

Les résines (25 μ L) ont été lavées 3 fois au PBS1X stérile, avant d'être ajoutées aux 2mL de milieu (tubes 3 et 4). Après une incubation de 2 heures sous agitation à température pièce, nous avons récupéré le surnageant, puis prélevé 40 μ L d'échantillons (pour IB). Les milieux ont ensuite été ajoutés aux P35 avec lamelles (après retrait des anciens milieux), pour une incubation de 24 heures avant fixation des lamelles.

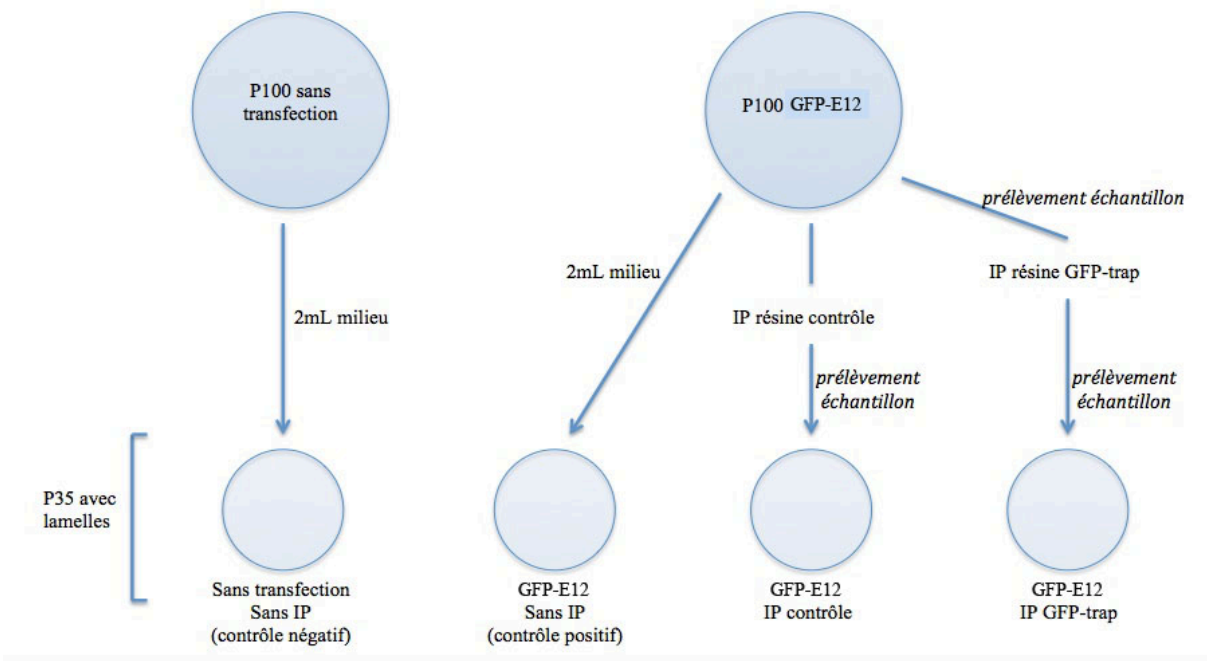


Figure 15. Schéma du protocole utilisé pour enlever le Tau du milieu de culture par immunoprécipitation

2.5. Immunobuvardage (IB)

2.5.1. Technique

2.5.1.1. Récolte

Aussi appelée technique du « Western Blot » (WB), l'IB nous permet de vérifier l'expression des formes mutantes transfectées à la fois dans le milieu extracellulaire, et le lysat. La récolte des échantillons se fait après un certain nombre d'heures, en fonction du TP choisi après la transfection.

Pour le milieu de culture des cellules HeLa dans les P35, nous l'avons prélevé puis déposé dans un tube stérile de 2mL. On l'a ensuite centrifugé pendant 10mn à 800g, à la température de la pièce - cela permet aux gros débris cellulaires d'être sédimentés au fond du tube. Nous avons ensuite transféré le surnageant dans un nouveau tube stérile de 2mL – c'est cet échantillon qui sera par la suite utilisé pour quantifier la quantité de Tau sécrétée.

Pour le lysat, une fois le milieu de culture retiré du P35, on a procédé immédiatement aux lavages des cellules. Elles ont été lavées 2 fois de suite avec du PBS1X à 37°C, puis une fois avec du PBS-NaCl 0,5 M à 37°C. Ces lavages permettent de bien décoller les protéines liées de façon non spécifique à la surface des cellules. On a ajouté ensuite le tampon de lyse (300µL à 500µL en fonction de la concentration finale voulue en protéine), qui est composé de NaCl, de Tris pH 7,5, de triton, de sodium deoxycholate (SDC), de SDS et d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free de Roche Diagnostics, USA). On a utilisé un grattoir à cellules pour bien décoller toutes les cellules du pétri, avant de transvaser le mélange « tampon de lyse + cellules » dans un tube stérile de 2mL, et de l'incuber sur glace 20 minutes (en vortexant au début et à la fin de l'incubation sur glace). Ceci va permettre au tampon de lyse d'agir pleinement pour permettre une lyse cellulaire totale. Suite à l'incubation, on a centrifugé le lysat 20 minutes à 16 100g et à 4°C. On a ensuite collecté le surnageant, que l'on a transvasé dans un tube stérile de 2mL.

2.5.1.2. Dosage de protéines

Afin de pouvoir déterminer la concentration en protéines dans le lysat cellulaire, nous avons effectué un dosage de protéines similaire à la technique de Lowry. Cette méthode se base sur la conception d'une gamme étalon faite à partir d'albumine de sérum bovin (« bovin serum albumin », BSA). Les échantillons ont été mélangés avec les réactifs de l'essai pour dosage de protéines « BioRad Dc protein assay kit » (BioRad Laboratories, Hercules, Ca, 500-0113), incubés entre 15 et 60 minutes puis lus à une longueur d'onde de 750nm sur un spectrophotomètre de type Ultrospec 2100pro. Chaque échantillon a été réalisé en duplicat, et on a ensuite calculé la moyenne entre les deux résultats obtenus. La concentration ainsi obtenue nous a servie à charger le gel de migration des échantillons avec la bonne quantité de protéines, à savoir 10µg par puits.

2.5.1.3. Migration sur gel

Nous avons dilué les échantillons avec une solution de SB4X, aussi appelé tampon de Laemmli (35% de glycérol, 19% de Tris-HCl 1,5M pH 6,8, 5% de bromophénol, 15% de SDS) à laquelle on a ajouté 20% de β-mercaptoéthanol (Sigma, USA, M3148) afin de briser les ponts disulfures – on a ensuite chauffé les échantillons dilués 5 minutes à 95°C. Sur un gel de polyacrylamide 10%, nous avons chargé les échantillons à raison de 20µL par puits pour les échantillons de milieu, et de 10µg de protéine pour les échantillons de lysat.

Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse, puis nous avons effectué un transfert sur membrane de nitrocellulose (0,45µm) (BioRad, USA, 162-0112). Comme référence, nous avons utilisé des poids moléculaires standards de chez Bio-Rad (« Precision Plus Protein standards »). Suite à quoi on a vérifié le bon transfert des protéines sur la membrane à l'aide de rouge Ponceau (Sigma, P7170), on a rincé la membrane à l'eau distillée, et bloqué la membrane dans du lait 5% dilué dans du TBST1X (« Tris buffered saline » avec 0,2% de Tween-20) durant 1 heure à température pièce (ou bien durant la nuit à 4°C) sous agitation.

Ensuite les membranes ont été marquées avec différents anticorps dirigés contre Tau (K9JA) ou bien la tubuline (en fonction des expériences, voir tableau II d'anticorps), grâce à

une incubation durant une nuit à 4°C et toujours sous agitation continue. Le lendemain, elles ont été lavées 3 fois 5 minutes au TBST avant d'être incubées 1 heure température pièce avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à une peroxydase HRP. Après quoi les membranes ont de nouveau été lavées 3 fois 5 minutes avec du TBST, puis on a révélé les échantillons de milieu par chimioluminescence avec l'ECL Clarity (BioRad, USA, 170-5061), et les échantillons de lysat avec l'ECL (GE Healthcare, UK, RPN2106). Le signal de chimioluminescence a été obtenu à l'aide d'un appareil ChemiDoc (BioRad, USA).

2.5.2. Quantification

La prise des images au ChemiDoc s'est faite via le logiciel ImageLab (BioRad, USA) dont on a utilisé deux fonctionnalités : «Chemi» pour la détection du signal, et «Colorimetric» pour prendre une image de la membrane où apparaissent les poids moléculaires.

C'est aussi avec Image lab que l'on a analysé la sécrétion de Tau, en faisant le ratio de la quantité de Tau dans le milieu extracellulaire, sur la quantité de Tau dans le lysat (lui même normalisé sur l'actine). Les statistiques des différentes expériences ont ensuite été faites à l'aide du logiciel GraphPad, par ANOVA et sans paier les résultats.

2.6. Immunofluorescence (IF)

2.6.1. Technique

L'IF est la technique que l'on a utilisé pour effectuer le marquage de l'appareil de Golgi. Après un lavage au PBS1X stérile à 37°C, les cellules HeLa (sur lamelles) ont été fixées grâce à de la paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du PBS contenant du sucrose durant 15 minutes. Elles ont ensuite subi 3 lavages successifs au PBS1X, avant d'être perméabilisées 5 minutes au triton 0,2% dans du PBS1X. Suite à la perméabilisation, les cellules ont été lavées 3 fois au PBS1X avant de subir un blocage au NGS («Normal Goat Serum», Life Technologies, USA, PCN500) 5% pendant 30 minutes. L'incubation avec les anticorps

primaires (K9JA 1/500 et GM130 1/50) dilués dans du PBS-NGS 5% a ensuite duré 1 heure température pièce, et a été suivie par 3 lavages au PBS1X.

Les anticorps secondaires utilisés (FITC anti-lapin 1/500 et Rhodamine anti-souris 1/500) dilués dans le PBS-NGS 5% étant photosensibles, il était important que leur incubation de 1 heure se fasse à l'abri de la lumière. Enfin, après 3 derniers lavages au PBS1X, nous avons monté les lamelles sur lame de verre (Leica Biosystems, microslides, 3800220) avec du milieu de montage contenant du DABCO (de type mowiol, Sigma, 81381, USA). Pour les expériences concernant la protéine VSVG (plasmide RFP-VSVG), les lamelles ont été directement montées sur lame de verre avec le milieu de montage et sans perméabilisation de la membrane du fait de la localisation membranaire de VSVG. Les images ont ensuite été prises à l'aide de deux microscopes à fluorescence Zeiss (Axioskop 2 plus et Imager.M2 Axiocam 506 mono) à l'aide d'un objectif 63X.

2.6.2. Quantification

L'analyse des images de microscopie à fluorescence, que ce soit pour les calculs d'aire des Golgi, le pourcentage de Golgi fragmentés, ou la distribution de la protéine VSVG, a été faite à l'aide du logiciel Image J du « National Institute of Health (NIH), et la superposition des images grâce à Adobe Photoshop CS3.

Le calcul de l'aire des Golgi a été possible grâce à une lame avec échelle, permettant une configuration du nombre de pixels en μm^2 . Nous avons pris une photo de différents champs éloignés les uns des autres sur la lamelle et on a analysé la morphologie du Golgi dans toutes les cellules qui se trouvent dans ces différents champs. Le Golgi a été minutieusement entouré afin de calculer son aire. On a ensuite fait une moyenne des différentes mesures, pour chaque condition. Pour ce qui est du nombre de Golgi fragmentés ou des pourcentages concernant la distribution de la protéine VSVG, ils ont été réalisés en prenant en compte un nombre de 100 cellules. On a alors classé le Golgi soit comme étant fragmenté soit comme étant compact, la protéine VSVG soit comme étant au RE soit comme étant à la membrane, puis on a établi ensuite des pourcentages de morphologie ou de distribution.

Tableau II. Tableau des différents anticorps utilisés pour l'immunobuvardage et l'immunofluorescence

Anticorps	Utilisation	Type	Dilution	Source	Numéro
K9JA	IB et IF	I ^R	IB : 1/15 000	Dako, Denmark	A 0024
			IF : 1/500		
GFP	IB	I ^R	1/1000	Chromotech, Allemagne	3H9
γ-Actine	IB	I ^R	1/5000	Santa Cruz Biotechnology Inc. USA	Sc-65635
GM130	IF	I ^R	1/50	BD Transduction Laboratories, USA	610823
α-Tubuline	IB	I ^R	1/1000	Sigma, St Louis, Missouri, USA	T 9026
Anti-tubuline acétylée	IB	I ^R	1/2000	Sigma, St Louis, Missouri, USA	T 6793
Anti-tubuline tyrosylée	IB	I ^R	1/5000	Sigma, St Louis, Missouri, USA	T 9028
FITC anti-rabbit	IF	II ^R	1/500	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. USA	711-096-152
Rhod anti-souris	IF	II ^R	1/500	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. USA	715-096-152

Alexa-350	IF	II ^R	1/500	Life Technologies, USA	A 11046
HRP-Lapin	IB	II ^R	1/15 000	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. USA	711-035-152
HRP-Rat	IB	II ^R	1/10 000	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. USA	112-035-062
HRP-Mouse	IB	II ^R	1/10 000	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. USA	115-035-068

3. Résultats

3.1. L'appareil de Golgi est fragmenté plus tôt suite à la surexpression de Tau hyperphosphorylée

3.1.1. Morphologie et surface de l'appareil de Golgi 48h post-transfection

Dans des études antérieures, nous avons démontré que Tau pouvait induire une fragmentation de l'AG (Liazoghli et al. 2005). Cependant, il n'était pas clair si la phosphorylation de Tau avait un impact sur ce phénomène. Nous avons donc surexprimé Tau dans des cellules HeLa afin d'observer la morphologie du Golgi 48 heures post-transfection, et de définir si l'état de phosphorylation de Tau impactait cette morphologie. Nous avons donc utilisé en plus de GFP-T4R de type sauvage et les mutants GFP-E12 et GFP-A12, mimant respectivement l'hyper- et l'hypophosphorylation. Nous avons choisi comme témoins l'absence de transfection (Abs), l'agent de transfection (GJ) seul ainsi que l'étiquette GFP seule (GFP). Une analyse quantitative du pourcentage de cellules qui présentaient un AG fragmenté a été effectuée (figures 16 et 17). Pour faire cette analyse, les cellules HeLa ont été fixées afin de réaliser des marquages immunofluorescents en utilisant comme anticorps primaires K9JA (1/500, un anticorps polyclonal dirigé contre la Tau totale) et GM130 (1/50, un anticorps monoclonal dirigé contre l'AG), révélés par des anticorps secondaires FITC anti-lapin (1/500) et Rhodamine anti-souris (1/500). En microscopie à fluorescence, la Tau apparaissait donc en vert et le Golgi en rouge (figure 18).

Nos résultats montrent que les cellules témoins (sans transfection, agent de transfection seul et étiquette GFP) présentent une morphologie assez compacte du Golgi, avec une surface comprise entre 130 et 200 μm^2 . La surexpression de GFP-T4R induit une surface Golgienne légèrement plus élevée, aux alentours de 210 à 250 μm^2 , traduisant une légère fragmentation de l'AG. Les résultats ont également mis en évidence un profil morphologique du Golgi différent entre GFP-T4R, GFP-E12 et GFP-A12, comme on peut le voir sur la figure 16. En effet, 48h après la transfection, le Golgi des cellules transfectées GFP-A12 est fortement fragmenté, avec

une surface deux fois supérieure ($450\mu\text{m}^2$) à celle des Golgi des cellules transfectées GFP-E12. Ces résultats semblent indiquer que le niveau de phosphorylation de Tau a un impact sur la fragmentation de l'AG.

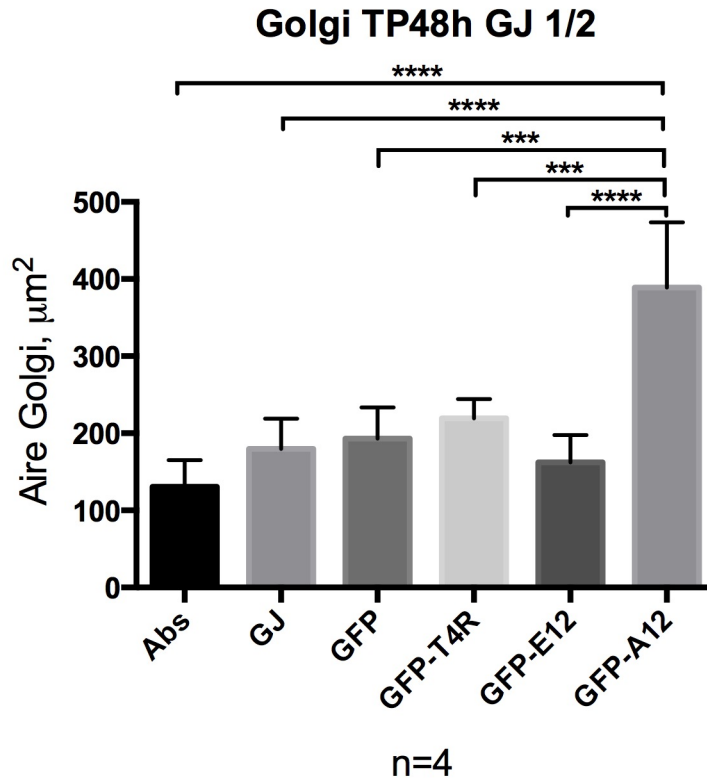


Figure 16. Surface de l'appareil de Golgi TP 48h

Figure traduisant l'aire moyenne des Golgi des cellules HeLa transfectées avec soit GFP seul (GFP), GFP-T4R, GFP-E12, GFP-A12, ou bien simplement mise en contact avec l'agent de transfection (GJ) ou sans transfection (Abs). Les cellules ont été fixées 48h après la transfection. (One-way ANOVA, Test Tukey, +/- SEM P value < 0,0001 pour ****).

3.1.2. Morphologie et surface de l'appareil de Golgi 30h post-transfection

Suite aux résultats du TP 48h concernant la morphologie du Golgi, nous nous sommes demandé si ces résultats étaient vrais en tout temps, ou bien si simplement ils étaient le reflet d'une vérité à un certain temps donné, à savoir 48h post-transfection. Nous avons donc répété l'expérience, cette fois ci en fixant les cellules 30 heures après la transfection, et nous avons observés des résultats différents du TP48h, comme le montre la figure 17.

En effet, si les valeurs de surface Golgienne induites par la transfection avec les témoins ($150-210\mu\text{m}^2$) ainsi que par la surexpression de GFP-T4R ($220-250\mu\text{m}^2$) sont similaires aux résultats obtenus à un temps post-transfection de 48h, on observe que l'aire du Golgi des cellules transfectées GFP-E12 a une surface 2 à 3 fois supérieure à l'aire du Golgi des cellules transfectées GFP-A12. Il apparait donc que tout d'abord, un mutant n'induit pas un profil de fragmentation constant et identique dans le temps, et enfin que le mutant hyperphospho-mimétique GFP-E12 induit une fragmentation de l'appareil de Golgi plus tôt dans le temps que le mutant hypophospho-mimétique, avec comme référentiel nos deux temps post-transfection à savoir 30h et 48h.

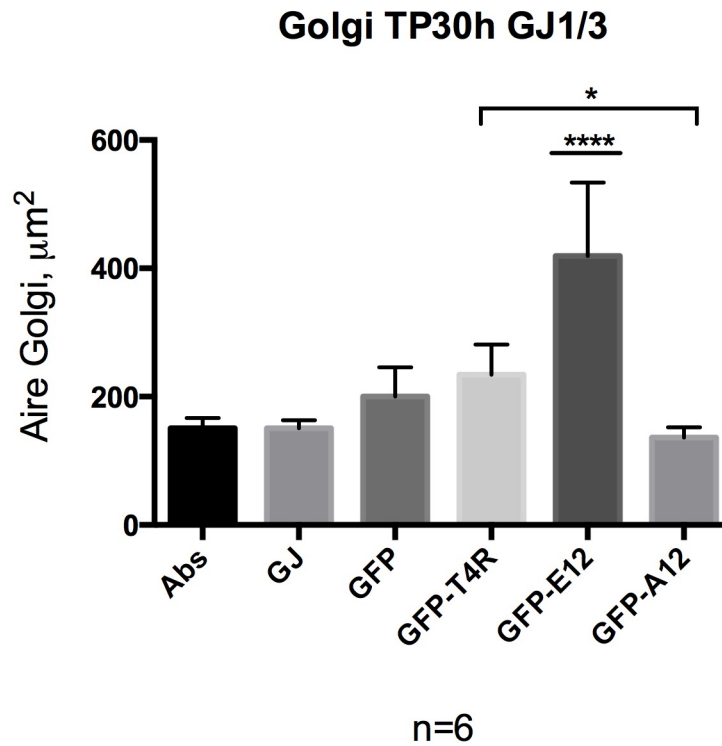


Figure 17. Morphologie et surface de l'appareil de Golgi TP 30h

Figure 17, représentant l'aire moyenne des Golgi des cellules HeLa transfectées avec soit GFP seul (GFP), GFP-T4R, GFP-E12, GFP-A12, ou bien simplement mise en contact avec l'agent de transfection (GJ) ou sans transfection (Abs). Les cellules ont été fixées 30h après la transfection. (One-way ANOVA, Test Tukey, +/- SEM P value < 0,0001 pour ****, la condition GFP-E12 apparait comme significativement supérieures aux autres conditions).

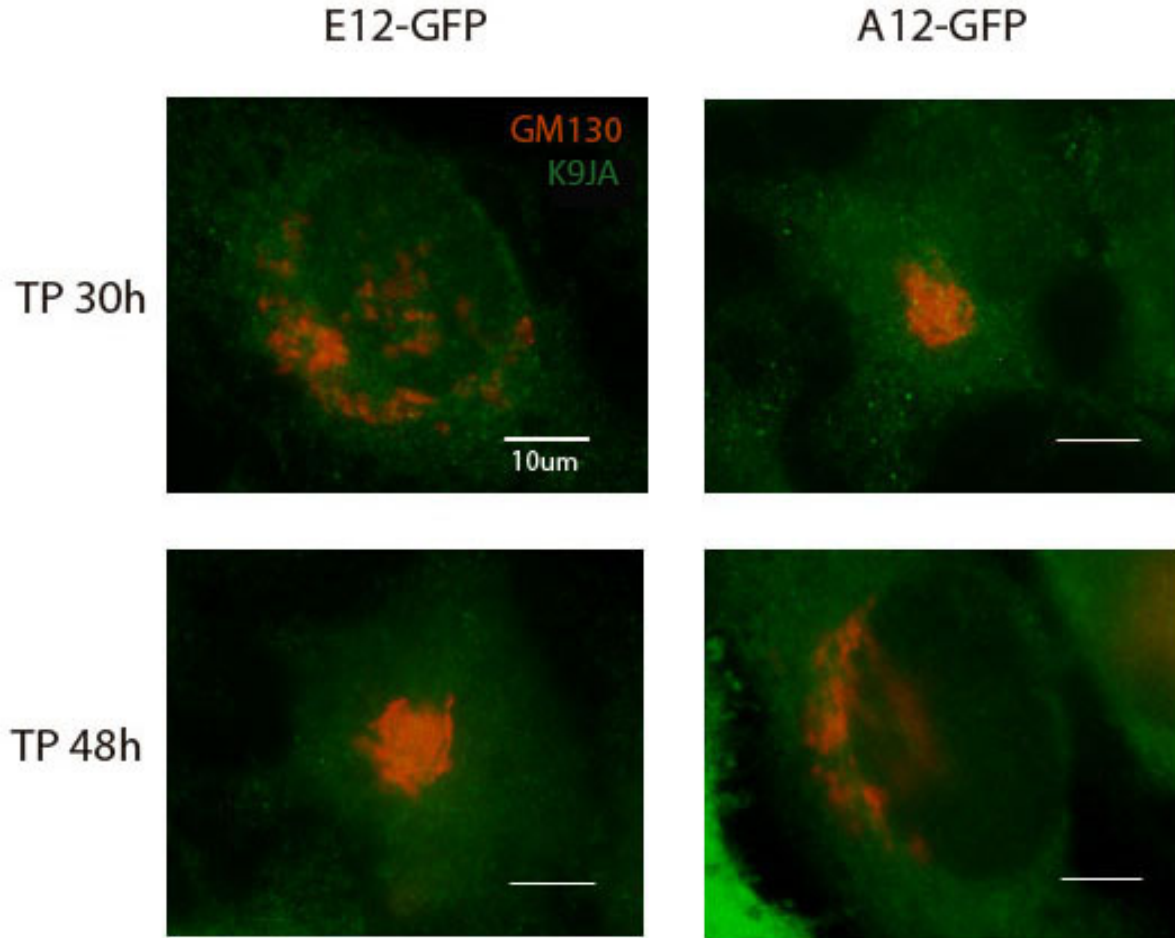


Figure 18. Morphologies de l'AG selon le TP et la phosphorylation de Tau

Figure représentant la morphologie de l'AG grâce au marquage GM130 (rouge sur l'image) dans les cellules HeLa transfectées soit avec GFP-E12 soit GFP-A12 (marquage de Tau avec K9JA, en vert sur l'image), à deux temps post-transfection : 30 et 48 heures.

3.2. La Tau extracellulaire est capable d'induire une fragmentation Golgienne

Dans la section précédente, nous avons démontré que la Tau peut induire une fragmentation de l'AG. Si nous savons que le peptide A β extracellulaire cause la fragmentation de l'AG (Joshi et al. 2014), pour ce qui concerne la Tau il n'a pas encore été défini si c'était la Tau extracellulaire ou intracellulaire qui a la capacité d'induire une telle fragmentation. En effet il a été démontré que la protéine Tau n'est pas simplement relâchée dans le milieu extracellulaire suite à la mort neuronale mais qu'elle peut être sécrétée de façon active par les neurones. Ceci a été observé en culture (Saman et al. 2012; Plouffe et al. 2012; Simón et al. 2012; Pooler et al. 2013; Mohamed et al. 2014; D. Hanger et al. 2014) ou la Tau est sécrétée sous forme libre et non incluse dans des exosomes, et également *in vivo* dans différents modèles de souris transgéniques qui expriment la Tau humaine (Barten et al. 2011; Yamada et al. 2011). Dans ces souris, la Tau a été détectée dans le liquide cébrospinal avant le début du processus neurogénérateur. Cette preuve de sécrétion par le neurone *in vivo* de la protéine Tau impose désormais un raffinement quand aux rôles de la Tau extracellulaire et de la Tau intracellulaire, notamment dans la fragmentation Golgienne. Ceci a été examiné dans la présente section.

3.2.1. La Tau hyperphosphorylée est majoritairement sécrétée, que ce soit à 30h ou bien 48h post-transfection

En parallèle des analyses de morphologie Golgienne, nous avons procédé à des analyses par WB du lysat ainsi que du milieu extracellulaire des cellules transfectées soit avec GFP-T4R, GFP-E12 ou bien GFP-A12. Nous avons examiné la sécrétion des mutants de Tau 48h et 30h après la transfection en les comparant à la sécrétion de GFP-T4R normalisé à 1. Nos résultats viennent confirmer les précédents travaux du laboratoire (Plouffe et al. 2012) car pour les deux temps post-transfection c'est bien la forme GFP-E12 hyperphosphorylée qui est la plus sécrétée (figure 19).

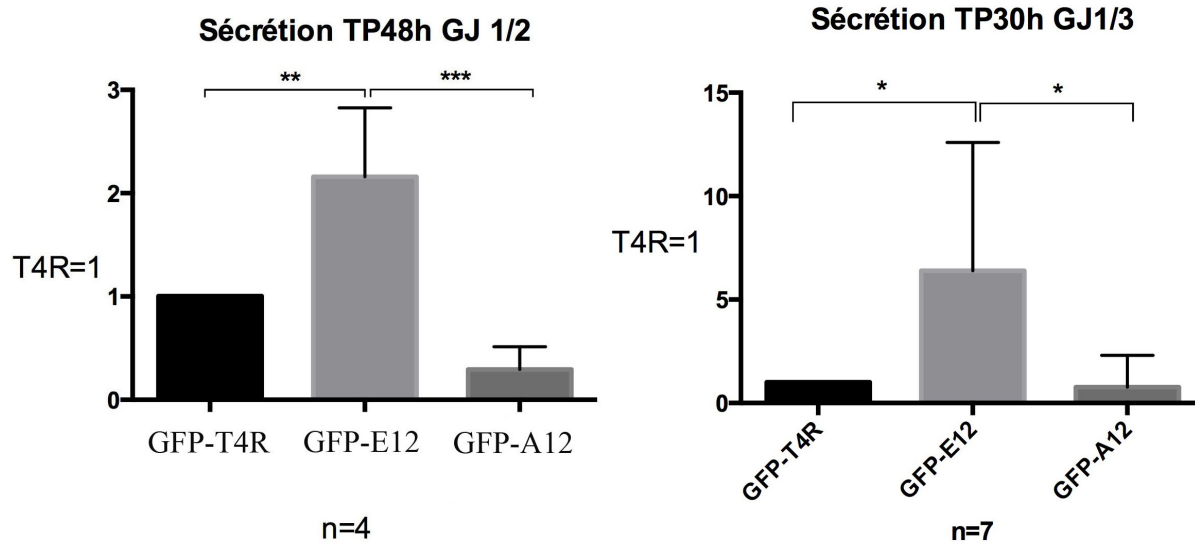


Figure 19. Sécrétion des mutants GFP-E12 et GFP-A12 avec GFP-T4R=1, TP30h et 48h

Figure représentant la sécrétion de Tau suite à la transfection des cellules HeLa avec soit GFP-T4R, GFP-E12 ou GFP-A12, à 48h et 30h post-transfection, avec résultats normalisés par rapport à GFP-T4R=1. (One-way ANOVA, Test Tukey, +/- SEM, pour 48h – P value = 0,0004 pour *** / pour 30h – P value = 0,0164 pour *). La forme hyperphosphorylée apparaît comme plus sécrétée aux deux temps post-transfection.

3.2.2. L'application de milieu contenant de la Tau hyperphosphorylée sur des cellules HeLa induit une fragmentation de l'appareil de Golgi

Afin de déterminer si la Tau extracellulaire avait la capacité d'induire une fragmentation de l'AG, nous avons transfecté des cellules HeLa avec GFP-T4R, GFP-E12 et GFP-A12. Après 48h, nous avons prélevé le milieu extracellulaire contenant de la Tau (confirmé par WB, figure 20) et nous l'avons appliqué sur des cellules HeLa sur lamelles, non transfectées, ensemencées 72h plus tôt (au même moment que les cellules ayant subi la transfection, mais en moins grand nombre – voir matériel et méthode). Suite à cela, nous avons laissé ce milieu 24h sur les cellules non transfectées, avant de procéder à leur fixation. Par la suite, les cellules fixées ont été marquées avec l'anticorps GM130 pour visualiser le Golgi.

Dans une première analyse, nous avons déterminé le pourcentage de cellules qui présentaient une fragmentation de l'AG suite à l'application de la Tau extracellulaire (figure 21, panneau du haut). Les témoins (sans transfection (Abs), et étiquette GFP seule (GFP)) présentent des valeurs similaires, à savoir qu'il y a entre 8 et 11% de cellules qui présentent un Golgi fragmenté pour ces conditions. Suite à l'application de milieu qui contient la GFP-T4R, on remarque qu'ici aussi, environ 10% des cellules ont un AG fragmenté. Cependant, lorsque l'on analyse les mutants, on remarque que de façon très nette, c'est le milieu avec la Tau hyperphosphorylée GFP-E12 qui induit le plus de fragmentation, avec entre 40 à 47% des Golgi fragmentés contre environ 10% pour GFP-A12.

Dans une seconde analyse, nous avons examiné la surface du Golgi. En effet, lorsque le Golgi est fragmenté, il devient dispersé dans le cytoplasme et donc il couvre une plus grande surface dans le corps cellulaire. À partir de la mesure de la surface du Golgi dans les différentes conditions (en μm^2), nous avons effectué une normalisation à partir des valeurs sans transfection (ratio Abs/Abs=1). Cette valeur a été définie comme étant une valeur « frontière » au dessus duquel on considère que le Golgi est fragmenté. Nous avons donc calculé les ratios des différentes conditions en les rapportant sur la valeur sans transfection (figure 21, panneau du bas). Les valeurs des deux témoins indiquent un ratio compris entre 1

et 1,3 tout comme GFP-T4R. Cependant, la Tau hyperphosphorylée GFP-E12 induit une valeur environ 2 fois supérieure à la valeur seuil avec un ratio de 2, contrairement au ratio représentant GFP-A12 qui est compris entre 1 et 1,2. Cette seconde méthode d'analyse, via la surface de l'AG, vient donc confirmer les résultats obtenus avec le pourcentage de cellules présentant un Golgi fragmenté.

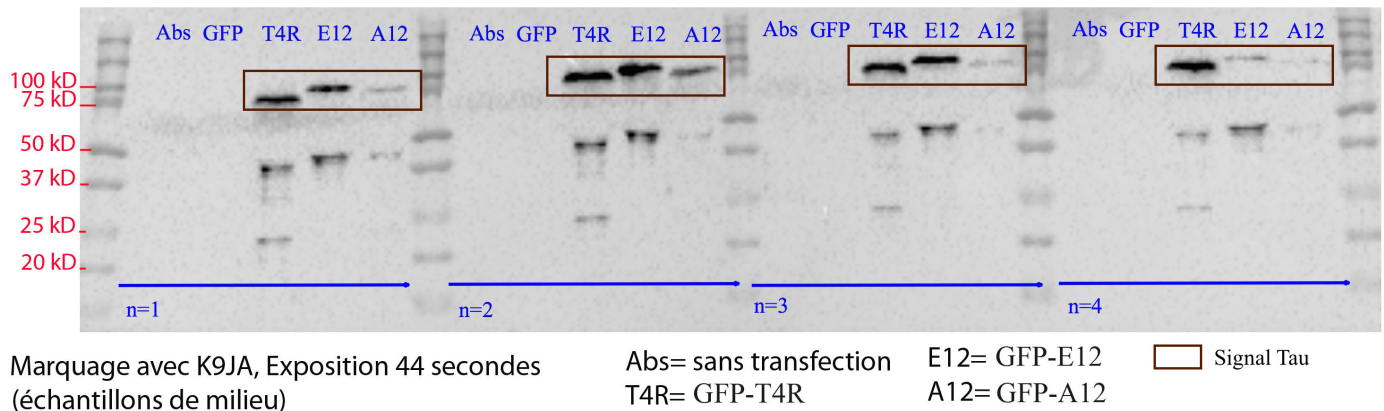
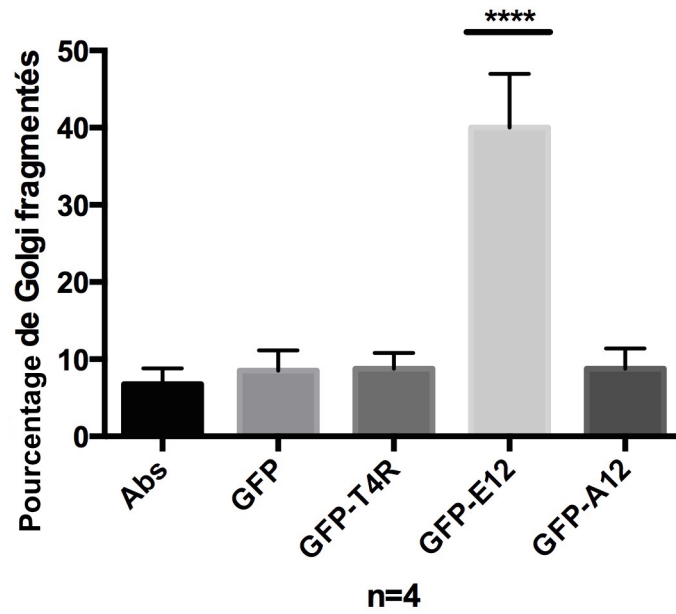


Figure 20. Confirmation de la présence de Tau par WB, Tau extracellulaire

Blot de confirmation de présence de Tau dans le milieu extracellulaire, 48h post-transfection.

Expérience Tau extracellulaire



Comparaison Golgi avec Threshold Abs = 1, Fragmenté > 1

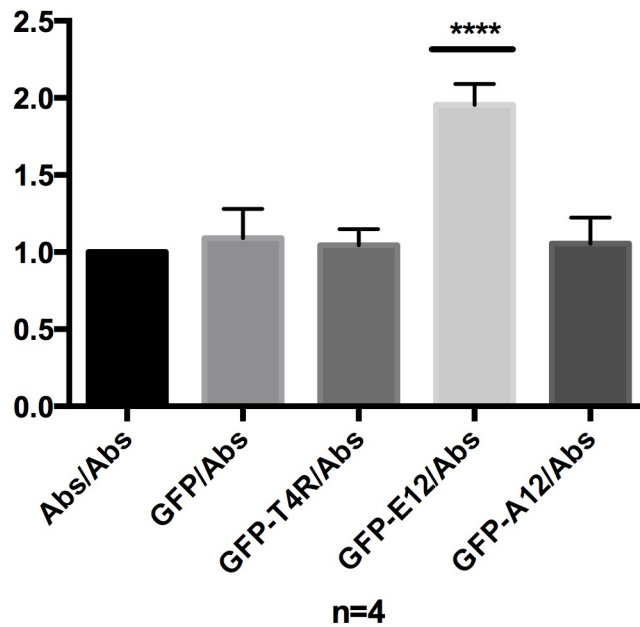


Figure 21. Résultats de l'effet de la Tau extracellulaire sur la morphologie du Golgi

Premier panneau : Pourcentage de Golgi fragmentés suite à l'application de milieu extracellulaire provenant de transfections avec soit GFP-T4R, GFP-E12, GFP-A12, GFP ou sans transfection (Abs). Le pourcentage de Golgi fragmentés suite à GFP-E12 extracellulaire apparaît comme significatif vis à vis de toutes les autres conditions (One-way ANOVA, Test Tukey, +/- SEM P value < 0,0001 pour ****). Second panneau : Comparaison de la fragmentation Golgienne suite à l'application de milieu extracellulaire, avec Abs/Abs=1. Le milieu GFP-E12 entraîne une fragmentation significativement plus importante que les autres conditions, qui apparaît fortement significative vis à vis de la référence Abs/Abs=1. (One-way ANOVA, Test Dunnett, +/- SEM P value < 0,0001 pour ****).

3.2.3. Confirmation de la fragmentation Golgienne par la Tau GFP-E12 extracellulaire

Après avoir observé l'effet de la Tau GFP-E12 extracellulaire, nous avons voulu vérifier si c'était bien l'action de la Tau GFP-E12 qui provoquait la fragmentation Golgienne, plutôt qu'un effet d'un facteur présent dans le milieu des cellules transfectées avec GFP-E12. Pour cette expérience, deux conditions ont été utilisées: des cellules HeLa sans transfection (Abs) et des cellules HeLa transfectées avec GFP-E12. Nous avons attendu 48h après la transfection pour enlever du milieu la Tau GFP-E12 par immunoprécipitation (IP) en utilisant soit une résine contrôle soit une résine « GFP-trap ». La résine GFP-trap contient un anticorps dirigé contre la protéine GFP qui capture toute protéine fusionnée à ce tag. De deux conditions au départ (sans transfection et transfection GFP-E12), nous sommes passé à 4 conditions à savoir (1) sans transfection et sans IP, (2) transfection GFP-E12 et sans IP, (3) transfection GFP-E12 et IP résine contrôle et (4) transfection GFP-E12 et IP GFP-trap.

Nous avons tout d'abord voulu nous assurer que les IP avaient bien fonctionné et c'est pourquoi durant le processus, nous avons recueilli des échantillons à 3 étapes: avant l'IP, après l'IP contrôle et après l'IP « GFP-trap ». Ces échantillons ont été analysés par WB (figure 22) afin de vérifier le bon fonctionnement et l'efficacité des IP réalisées. Les résultats ont été normalisés en prenant comme référence les données avant IP (=1). La différence observée entre les résultats avant IP et après IP contrôle était non significative, alors qu'il y avait une

différence significative entre les échantillons avant IP et après IP contrôle et après IP « GFP-trap ». Ceci confirmait que nos IP ont fonctionné correctement.

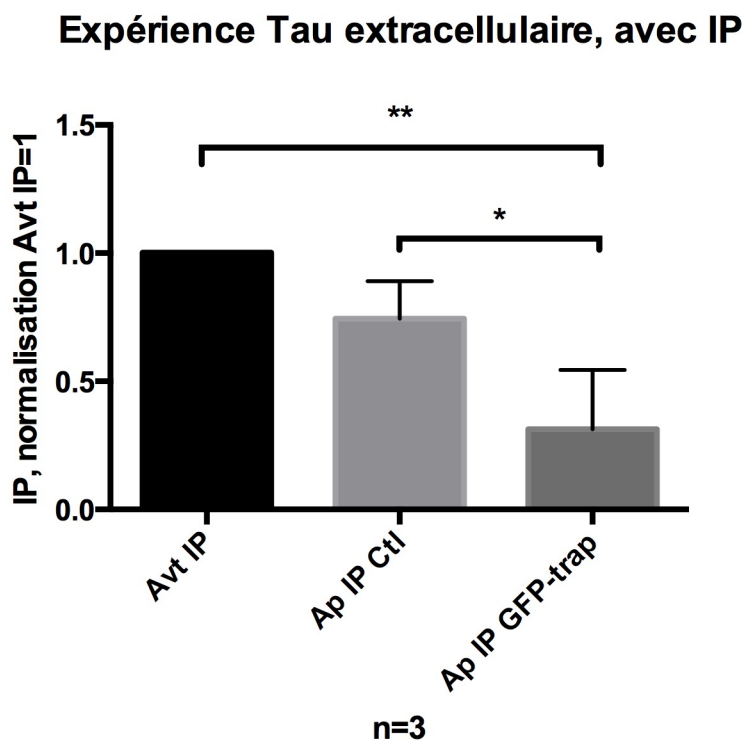


Figure 22. Analyse par WB des échantillons de l'IP

Avt IP : avant IP ; Ap IP Ctl : après IP contrôle ; Ap IP GFP-trap : après IP GFP-trap

Figure représentant les résultats de Western Blot des échantillons avant IP, après IP témoin et après l'IP GFP-trap. Les résultats entre le avant et le après IP témoin ne montrent pas de différence significative, contrairement aux résultats suivant l'IP GFP-trap ce qui confirme son bon fonctionnement. (One-way ANOVA, Test Tukey, +/- SEM P value = 0,0050 pour **).

Le milieu des différentes conditions (Avt IP , Ap IP Ctl , Ap IP GFP-trap) a ensuite été appliqué sur des cellules HeLaensemencées sur lamelles n'ayant pas été transfectées (voir matériel et méthode). Après un temps d'incubation de 24h, nous avons fixé les cellules pour une étude de la morphologie Golgienne par IF. Nous avons analysé le pourcentage des Golgi

qui étaient fragmentés sur 100 cellules suite à l'application du milieu extracellulaire, et nous avons pu observer plusieurs phénomènes (figure 23).

Tout d'abord on remarque que le taux le plus bas de Golgi fragmentés est causé par le milieu de la condition sans transfection et sans IP (sans GFP-E12, sans IP) avec environ 10% de Golgi fragmentés. Ensuite, on observe que les valeurs entre la condition avec transfection GFP-E12 mais sans IP (GFP-E12, sans IP) et la condition avec transfection GFP-E12 et IP contrôle (GFP-E12, IP Ctl) sont presque identiques, ce qui vient renforcer le bon fonctionnement de notre résine contrôle. Enfin, on observe une différence significative entre le nombre de Golgi fragmentés pour la condition « GFP-E12, sans IP » comparativement à la condition « GFP-E12, IP GFP-trap » (avec transfection GFP-E12 puis une IP « GFP-trap »). Ce dernier résultat permet de confirmer que l'effet de fragmentation Golgienne est bien dû à GFP-E12.

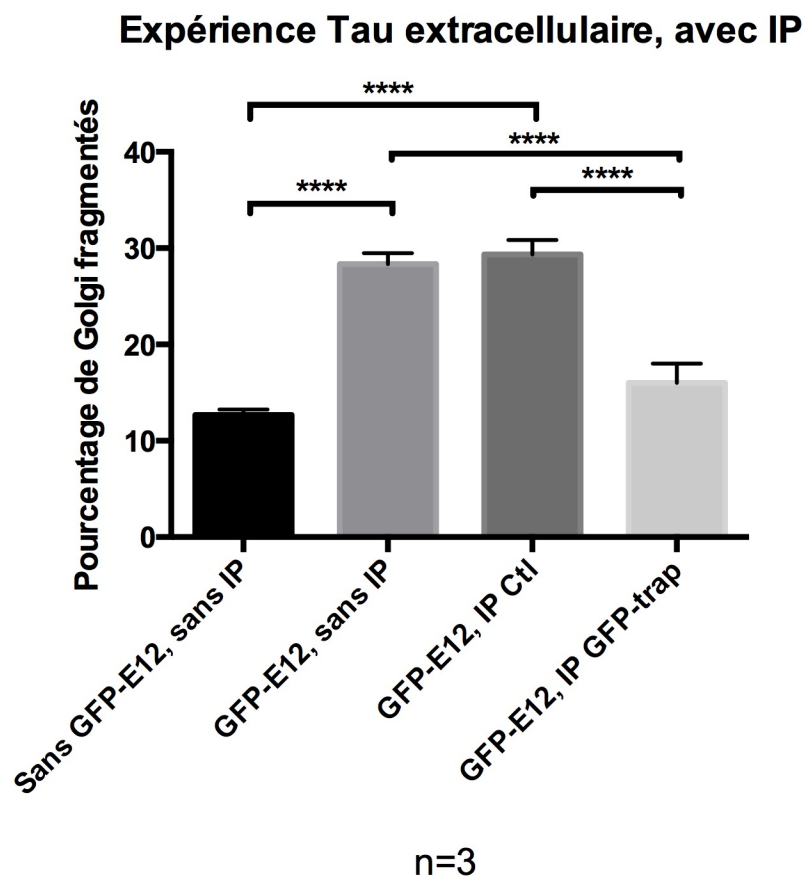


Figure 23. Pourcentage de Golgi fragmentés, expérience avec IP

Pourcentage de cellules avec Golgi fragmenté suite à la mise en contact avec le milieu extracellulaire avec ou sans IP. (One-way ANOVA, Test Tukey, +/- SEM P value < 0,0001 pour ****).

3.2.4. Phénomène dose-dépendent

Comme l'ont montré de précédents travaux du laboratoire (Plouffe et al. 2012), l'hyperphosphorylation entraîne une sécrétion accrue de Tau. Nous nous sommes donc demandé si les résultats indiquant que GFP-E12 extracellulaire induit une fragmentation de l'AG étaient dus à l'hyperphosphorylation de Tau ou bien au fait que GFP-E12 était simplement présente en plus grande quantité.

C'est pour répondre à cette question que nous avons effectué une série d'expériences qui consistait à incuber des cellules HeLa non-transfectées dans du milieu contenant GFP-E12 qui avait été dilué afin d'obtenir des concentrations décroissantes de GFP-E12 (figure 24). Du milieu de culture de cellules HeLa non-transfectées a été utilisé pour les dilutions du milieu qui contenait GFP-E12. Tout d'abord, nous avons confirmé la présence de GFP-E12 dans le milieu non-dilué et dilué par WB (figure 25). Au cours de ces expériences, nous nous sommes demandé si à quantité égale de Tau, entre GFP-T4R et GFP-E12, le pourcentage de Golgi fragmentés allait être équivalent. Les résultats de dilution semblent nous indiquer que la dilution de GFP-E12 pour avoir une quantité équivalente à GFP-T4R est comprise entre 4/8 et 2/8 (et même entre 4/8 et 3/8). Nous avons donc examiné avec attention les résultats de fragmentation Golgienne au niveau de ces dilutions.

Plus particulièrement, une analyse du pourcentage de Golgi fragmentés en fonction des dilutions de GFP-E12, par rapport à GFP-T4R et GFP-A12 non dilués a été effectuée (figure 26). Les résultats indiquent que moins il y a de GFP-E12 extracellulaire, moins on observe de fragmentation Golgienne. De façon intéressante, c'est la dilution 2/8 de GFP-E12 qui semble induire une fragmentation similaire à celle induite par la GFP-T4R extracellulaire. Ces résultats montrent donc qu'il existe une relation dose-dépendante entre la Tau extracellulaire et la fragmentation de l'AG.

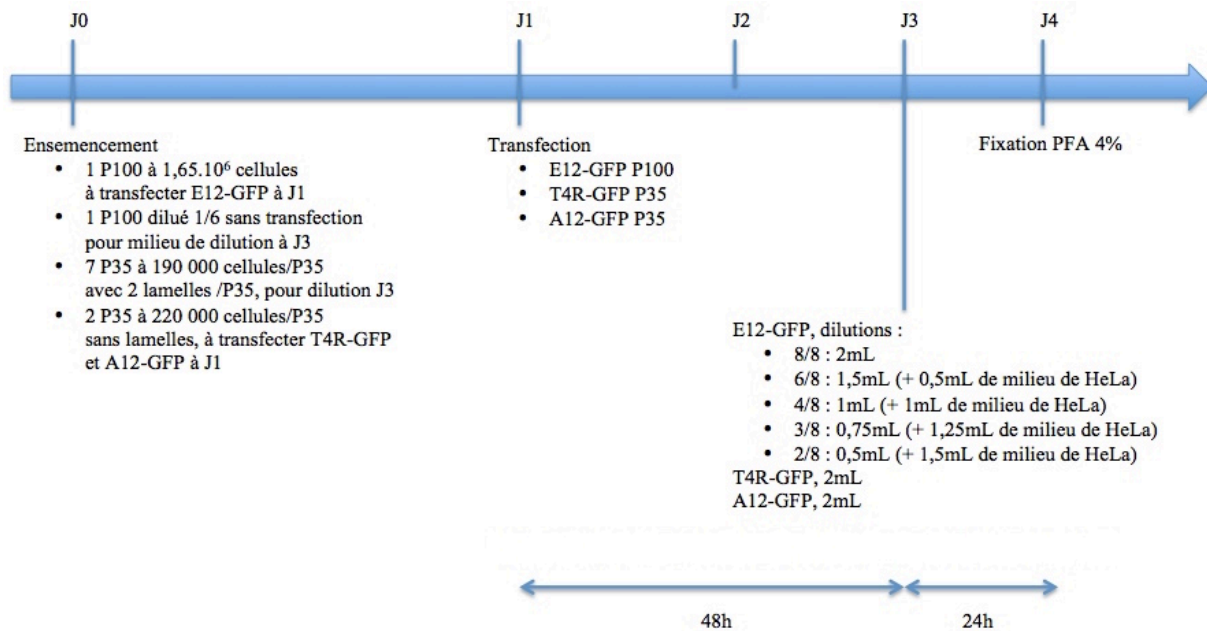


Figure 24. Schéma du protocole utilisé pour les expériences de dilution du milieu GFP-E12

Jour 0 (J0), Jour 1 (J1), Jour 2 (J2), Jour 3 (J3) et Jour 4 (J4)

Représentation schématique du protocole des expériences de dilution du milieu GFP-E12.

Expérience de Dilution, Tau extracellulaire

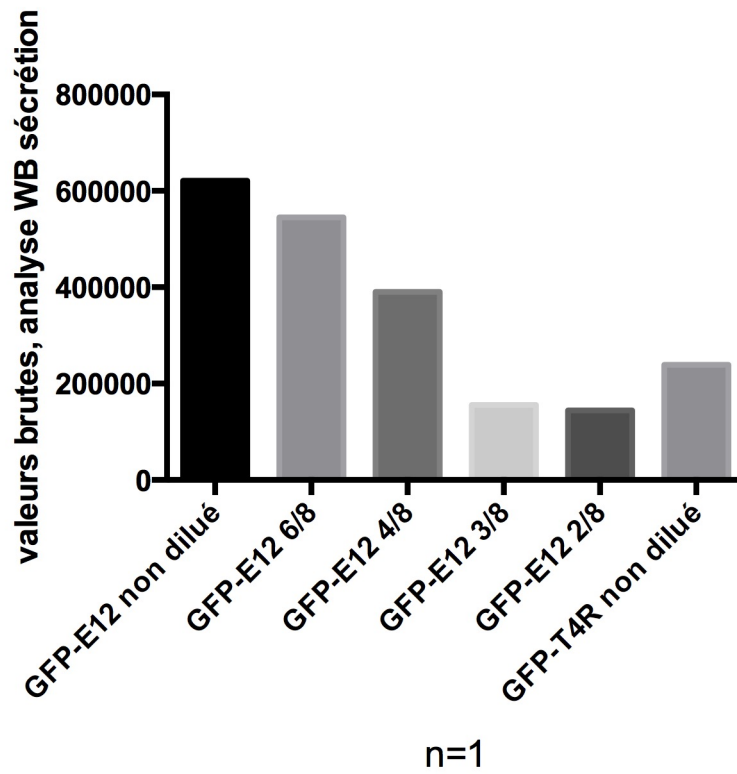


Figure 25. Confirmation de la dilution de Tau extracellulaire par WB

Représentation de la quantité décroissante de Tau présente dans le milieu extracellulaire suite aux dilutions.

Expérience de Dilution, Tau extracellulaire milieu laissé 24h sur lamelles avant fixation

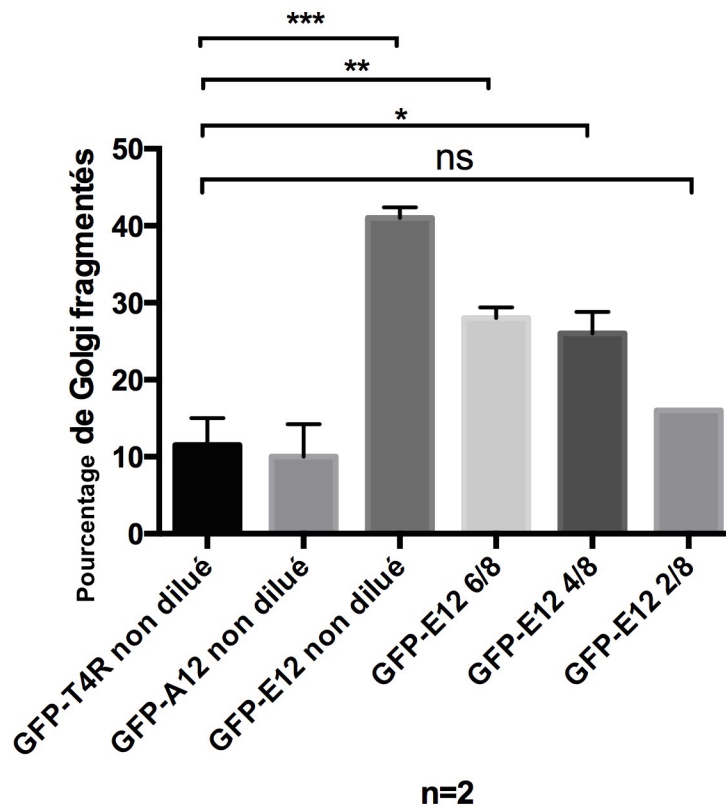


Figure 26. Dose-dépendance du phénomène de fragmentation par la Tau GFP-E12 extracellulaire, tendance sur 2(n)

Représentation de l'effet de dose dépendance entre la quantité de Tau présente dans le milieu extracellulaire et le pourcentage de cellules au Golgi fragmenté. (One-way ANOVA, Test Tukey, +/- SEM P value = 0,0002 pour ***). On remarque que si la Tau extracellulaire non diluée GFP-T4R et GFP-A12 entraîne un pourcentage de fragmentation similaire, la Tau GFP-E12 non diluée entraîne une fragmentation Golgienne plus importante, effet qui diminue au fil de la dilution.

3.2.5. La Tau extracellulaire, probable responsable de la fragmentation Golgienne

Si les résultats précédents nous indiquent que la Tau extracellulaire a la capacité d'induire une fragmentation de l'AG, nous avons voulu examiner si la Tau intracellulaire pouvait également contribuer à cette fragmentation (ou les 2). Nous avons donc comparé les pourcentages de cellules qui présentaient un Golgi fragmenté lorsque les différentes formes de Tau étaient surexprimées (GFP-T4R, GFP-E12, GFP-A12) avec ceux obtenus lors l'incubation de cellules HeLa non-transfectées avec du milieu qui contenait une des différentes formes de Tau (figure 27). Nous avons choisi de faire la comparaison avec les pourcentages obtenus à 30h post-transfection puisque ce temps correspondait au plus haut pourcentage de fragmentation Golgienne observé suite à la surexpression de GFP-E12.

Dans le cas de l'absence de transfection, on voit que le nombre de cellules avec Golgi fragmenté est similaire peu importe si on laisse le milieu 30h sur les cellules ou si un nouveau milieu extracellulaire qui ne contient pas Tau est ajouté, à savoir autour de 10%. En ce qui concerne les témoins (agent de transfection GJ et étiquette GFP – le témoin GJ n'étant pas présent pour l'expérience de Tau extracellulaire), à 30h post-transfection l'agent de transfection comme la GFP seule induisent une fragmentation du Golgi dans 16 à 20% des cellules, alors que lors de l'expérience avec les milieux on se situe plutôt autour de 10%. Les valeurs de GFP-T4R sont quant à elles similaires, sa surexpression 30h post-transfection induisant entre 12 et 15% de Golgi fragmentés, et la GFP-T4R extracellulaire induit environ 10% de fragmentation. Quant aux mutants, nous avons également remarqué des similitudes avec une surexpression de GFP-A12 30h après la transfection qui provoque la fragmentation de 12 à 16% des Golgi contre 10-11% suite à l'incubation avec GFP-A12 extracellulaire. Enfin, nos résultats indiquent que la surexpression de GFP-E12 provoque la fragmentation des AG dans environ 30% des cellules, contre 40% suite à l'incubation avec du milieu contenant GFP-E12.

La forte similitude entre ces valeurs nous a donc laissé penser que non seulement la Tau extracellulaire a la capacité d'induire une fragmentation de l'AG, mais qu'elle en est la principale responsable. Cependant il est important de noter que nous avons utilisé du milieu de

48h post-transfection pour les expériences avec la Tau extracellulaire. C'est le mutant GFP-A12 qui a induit le plus haut pourcentage de fragmentation à ce temps post-transfection. Le fait que nous n'avons pas observé de fragmentation avec le milieu qui contenant ce mutant peut s'expliquer de deux façons. Premièrement, les cellules ont seulement été incubées pendant 24h avec le milieu qui contenant la Tau. Une incubation de 24h n'était peut être pas suffisante pour l'induction d'une fragmentation par GFP-A12. Deuxièmement, ce résultat pourrait nous indiquer que c'est la GFP-A12 intracellulaire qui était responsable de la fragmentation.

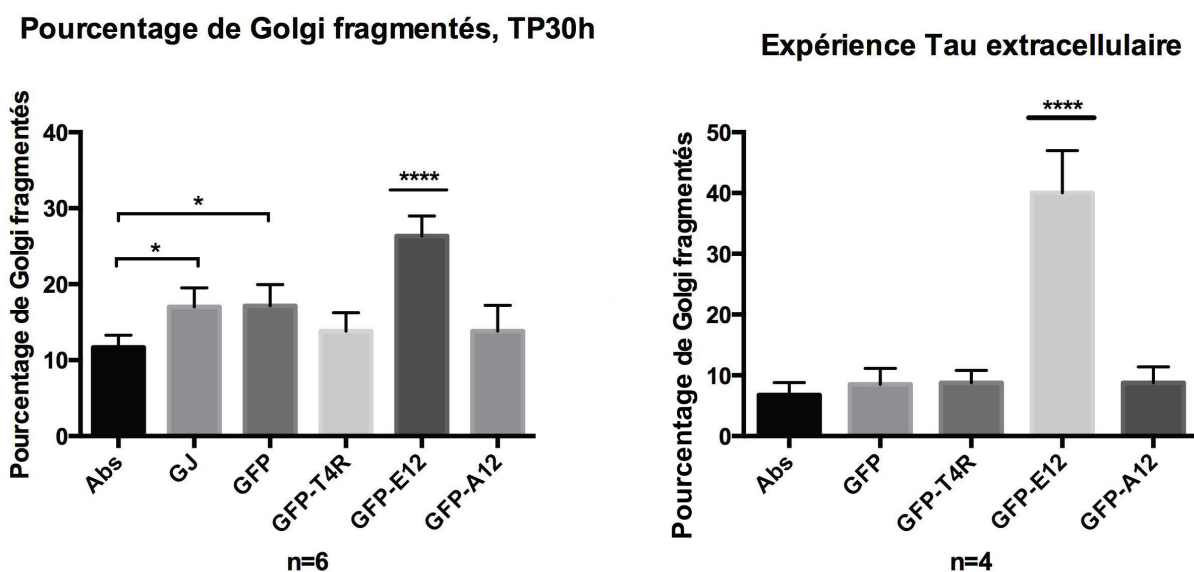


Figure 27. Comparaison du nombre de cellules avec Golgi fragmenté au TP30h et expérience Tau extracellulaire

Mise en parallèle des résultats observés en terme de pourcentage de Golgi fragmentés (One-way ANOVA, Test Tukey, P value < 0,0001 pour ****) dans les cellules sans transfection (Abs), avec agent de transfection (GJ), avec GFP, ou bien GFP-T4R, GFP-E12, GFP-A12 et suite à l'expérience de Tau extracellulaire ou le taux de Golgi fragmenté avec GFP-E12 extracellulaire est significativement supérieur à toutes les autres conditions (issu de Figure 21 premier panneau, One-way ANOVA, Test Tukey, P value < 0,0001 pour ****) +/- SEM. Le panneau de gauche représente le pourcentage de cellules transfectées avec la Tau humaine qui présentent un Golgi fragmenté.

3.3. Le domaine de liaison aux microtubules et la fragmentation Golgienne

3.3.1. La surexpression de la partie carboxy-terminale de Tau induit une importante fragmentation Golgienne

Dans cette série d'expériences, nous avons voulu identifier le domaine de Tau qui était responsable de l'induction de la fragmentation du Golgi. Il existe une vaste littérature (G. Haase and Rabouille 2015; Ho et al. 1989; Wehland et al. 1983; Thyberg and Moskalewski 1999; Jin and Snider 1993; Bellouze et al. 2016; Turner and Tartakoff 1989) rapportant l'implication des MTs dans la fragmentation du Golgi. Cela nous a amené à nous demander si le MTBD de Tau était nécessaire à la fragmentation de l'AG.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé les plasmides GFP-Nt et GFP-Ct qui correspondent à des fragments de Tau qui contiennent le N-terminal et C-terminal de Tau, respectivement, insérés dans le vecteur pEGFP-C1, en prenant parti du fait que le fragment GFP-Ct contient le MTBD. Nous avons transfecté des cellules ensemencées sur lamelles soit avec GFP-T4R, GFP-Nt ou GFP-Ct, puis 48h plus tard nous avons fixé les cellules pour procéder à l'analyse de la fragmentation du Golgi. Pour ce faire, les cellules ont été marquées avec les anticorps primaires K9JA (dirigé contre Tau) et GM130 (dirigé contre le Golgi), révélés avec les anticorps secondaires Rhodamine anti-souris et FITC anti-lapin. Nous avons observé que la surexpression de GFP-Ct induisait la fragmentation du Golgi de 2 fois plus de cellules que la surexpression de GFP-T4R et GFP-Nt (figure 28). En effet, nos résultats indiquent que la surexpression de GFP-Nt induit un taux de Golgi fragmentés similaire à GFP-T4R, autour de 20%.

Expérience Nt/Ct, TP 48h

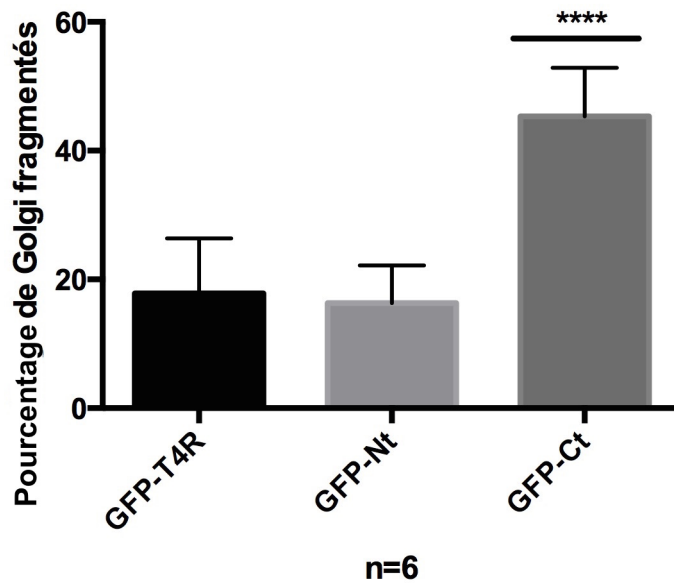


Figure 28. Pourcentage de Golgi fragmentés suite à la surexpression de GFP-Nt et GFP-Ct

Figure montrant le pourcentage de cellules à Golgi fragmenté suite à la transfection avec soit GFP-T4R, GFP-Nt ou GFP-Ct. (One-way ANOVA, Test Tukey, +/- SEM P value < 0,0001 pour ****).

Bien que les résultats présentés dans la section précédente indiquaient que c'est la Tau extracellulaire qui induisaient la fragmentation de l'AG, les présents résultats nous portaient à croire que la Tau intracellulaire pouvait également contribuer à la fragmentation du Golgi en modifiant les MTs. En effet, la littérature (Skoufias, Burgess, and Wilson 1990; Bellouze et al. 2014) fait état du lien entre la stabilité des MTs et la morphologie du Golgi. Nous avons donc décidé d'investiguer plus en détail la stabilité des MTs lorsque les différentes formes de Tau étaient surexprimées dans les cellules HeLa.

3.3.2. La surexpression de Tau ne modifie pas la stabilité des microtubules dans les cellules HeLa

Il existe une grande littérature qui fait état de phénomènes post-translotionnels de l' α -tubuline (Raybin and Flavin 1977; Barra et al. 1974; Webster et al. 1987). Il se trouve que des études ont défini que la tubuline détyrosylée et la tubuline acétylée conféraient une plus grande stabilité aux MTs (Jasmin, Changeux, and Cartaud 1990; Yoshiyama et al. 2003; Skoufias, Burgess, and Wilson 1990; Kreis 1987), contrairement à la tyrosylation qui a tendance à rendre les MTs moins stables (Kreis 1987; Gundersen, Kalnoski, and Bulinski 1984; Bulinski, Gundersen, and Webster 1987). L'AG se servant des MTs comme de rails (Skoufias, Burgess, and Wilson 1990; Bellouze et al. 2014; Wehland et al. 1983; Ho et al. 1989), une déstabilisation des MTs entraîne une fragmentation du Golgi. Nous nous sommes donc demandé si l'importante fragmentation Golgienne suite à la surexpression de GFP-Ct avait pour origine une forte tyrosylation ou une faible acétylation de la tubuline.

Nous avons donc analysé par WB les modifications post-translotionnels de l' α -tubuline dans les lysats des cellules transfectées avec GFP-T4R, GFP-E12, GFP-A12, GFP-Nt, et GFP-Ct (figure 29). Nous avons effectué des marquages en utilisant des anticorps contre la tubuline totale (α -tubuline), contre la tubuline acétylée et contre la tubuline tyrosylée (voir tableau II). À partir d'une quantification par densitométrie des signaux obtenus par WB, nous avons calculé les ratio « tubuline tyrosylée/tubuline totale » et « tubuline acétylée/tubuline totale », afin de savoir si une forme prédominait, notamment lors de la surexpression de GFP-Ct (figure 30). Les résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative au niveau des ratio rapportant la tubuline acétylée et la tubuline tyrosylée sur la tubuline totale, et ce indépendamment du niveau de phosphorylation (GFP-E12 ou GFP-A12) ou de la présence du MTBD (GFP-Nt ou GFP-Ct). Ces résultats indiquent fortement que l'effet de GFP-Ct sur la fragmentation de l'AG ne dépend pas de sa liaison aux MTs. De plus, ces résultats viennent soutenir notre hypothèse selon laquelle ce n'est pas la Tau intracellulaire qui est responsable de la fragmentation Golgienne, mais la Tau extracellulaire.

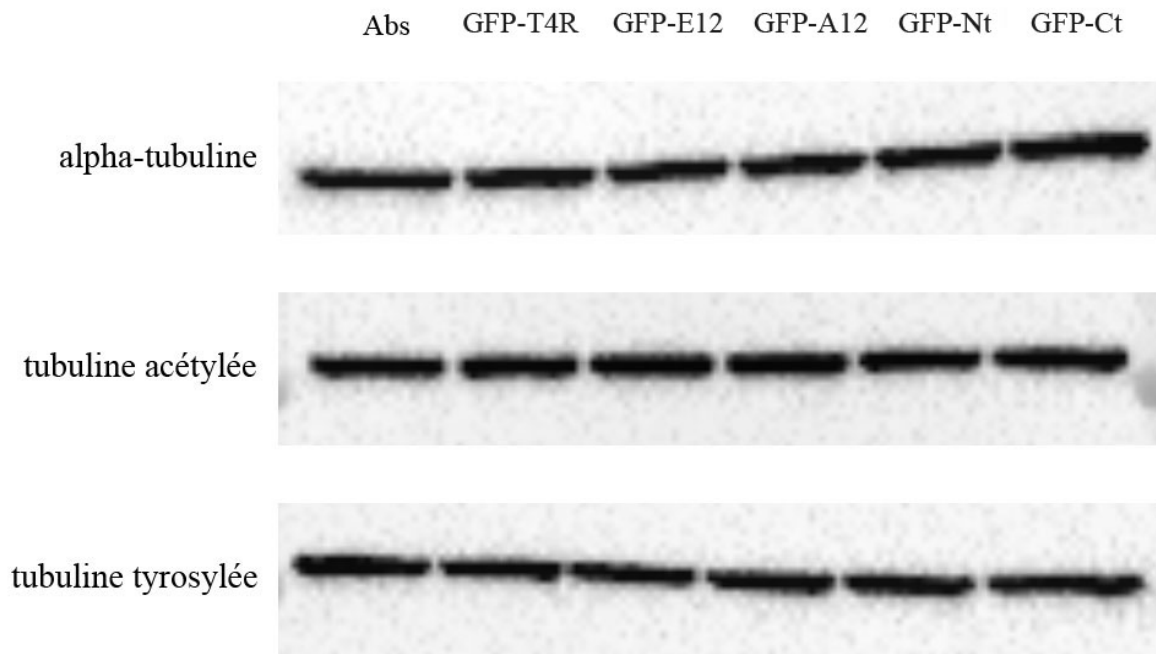


Figure 29. Expression de la tubuline totale, acétylée et tyrosylée

Blot représentant le signal tubuline, tubuline acétylée et tubuline tyrosylée des échantillons n'ayant pas eu de transfection (Abs), ou avec transfection GFP-T4R, GFP-E12, GFP-A12, GFP-Nt, GFP-Ct.

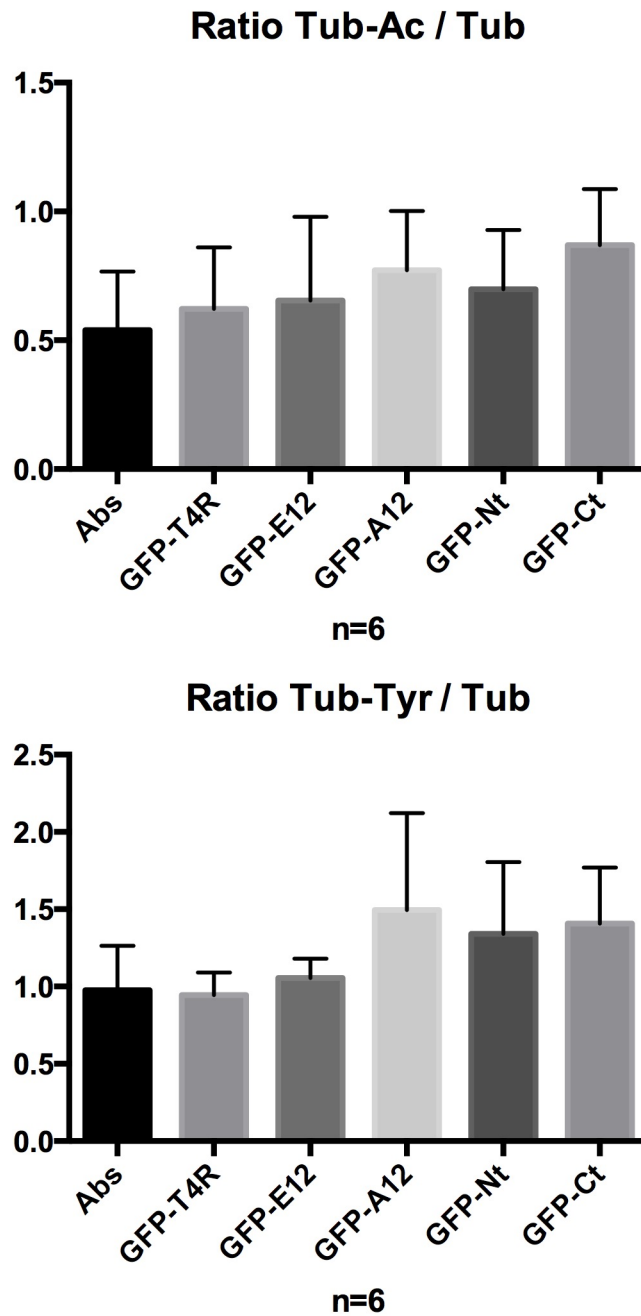


Figure 30. Ratio « Tubuline acétylée / Tubuline totale » et « Tubuline tyrosylée / Tubuline totale »

Représentation des ratio fait entre la tubuline acétylée et la alpha-tubuline ainsi qu'entre la tubuline tyrosylée et la alpha-tubuline. Les résultats apparaissent comme non significatifs pour toutes les conditions. (One-way ANOVA, Test Tukey, résultats non significatifs – Tub-Ac/Tub, +/- SEM P value = 0,2830 – Tub-Tyr/Tub, P value = 0,0611).

3.4. La surexpression de GFP-T4R dans les cellules HeLa n'impact pas le transport de la protéine VSVG à la membrane plasmique

3.4.1. Impact de la température sur le transport de VSVG

Nous nous sommes ensuite demandé si le Golgi restait fonctionnel malgré l'observation de ces phénomènes de fragmentation. Comme l'ont déjà démontré plusieurs études (Nehls et al. 2000; Presley et al. 1997), il est possible de suivre le trafic entre le RE et le Golgi, puis plus largement entre le RE et la membrane plasmique grâce à la protéine RFP-VSVG. En effet, à 40°C la protéine VSVG est mal repliée et de ce fait retenue au RE, alors qu'à 32°C elle peut se rendre jusqu'à la membrane plasmique.

Nous avons donc voulu voir si nous pouvions répliquer ces résultats avec des cellules HeLa en faisant appel à une co-transfection entre le plasmide GFP et RFP-VSVG, tout d'abord en laissant les cellules 24 heures à 37°C après la transfection, puis 24h à 39,5°C suivi de 2 heures à 32°C, en fixant des cellules après les incubations à 39,5°C et 32°C. Comme le montre la figure 31, on observe bien une nette différence de la distribution de la protéine VSVG en fonction de la température. RFP-VSVG était au RE de 70% des cellules incubées à 39,5°C, contre seulement 35% lors de l'incubation à 32°C.

Distribution de la protéine VSVG en fonction de la température

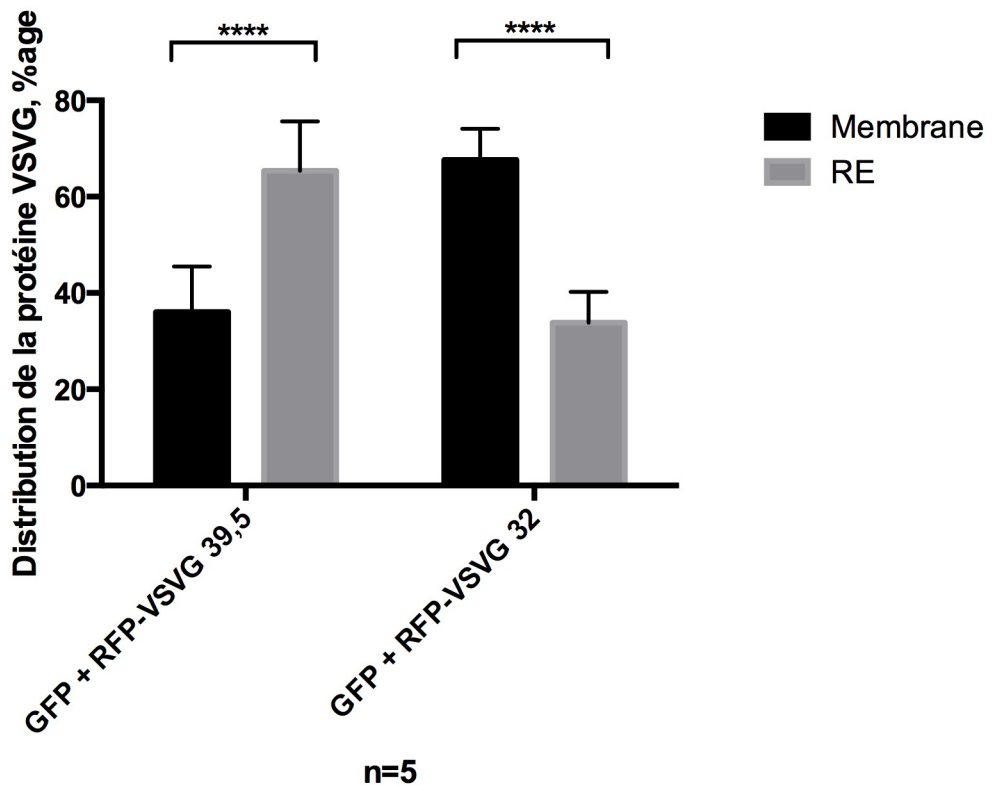


Figure 31. Confirmation de la relation entre la température et la distribution de la protéine VSVG

Représentation de la distribution de la protéine VSVG en fonction de la température, hors surexpression de Tau. La protéine VSVG apparaît être significativement plus présente à la membrane suite à une incubation à 32 degrés, contre le RE à 39,5 degrés. (Two-way ANOVA, Test Sidak, +/- SEM P value < 0,0001 pour ****).

3.4.2. L'appareil de Golgi demeure fonctionnel lors de la surexpression de GFP-T4R

Nous nous sommes ensuite logiquement demandé si la surexpression de GFP-T4R induisait un changement dans le trafic protéique entre le RE et le Golgi. Nous avons donc comparé la distribution de la protéine RFP-VSVG en cas de co-transfection GFP-T4R/RFP-VSVG versus une co-transfection GFP/RFP-VSVG, toujours aux mêmes températures que précédemment (39,5°C et 32°C).

Quand on compare la distribution de VSVG aux différentes températures dans les cellules co-transfectées, il n'y a pas de différence significative (figures 32 et 33). La surexpression de Tau ne semble donc pas impacter le trafic protéique qu'il existe entre le RE et le Golgi, le Golgi demeurant fonctionnel.

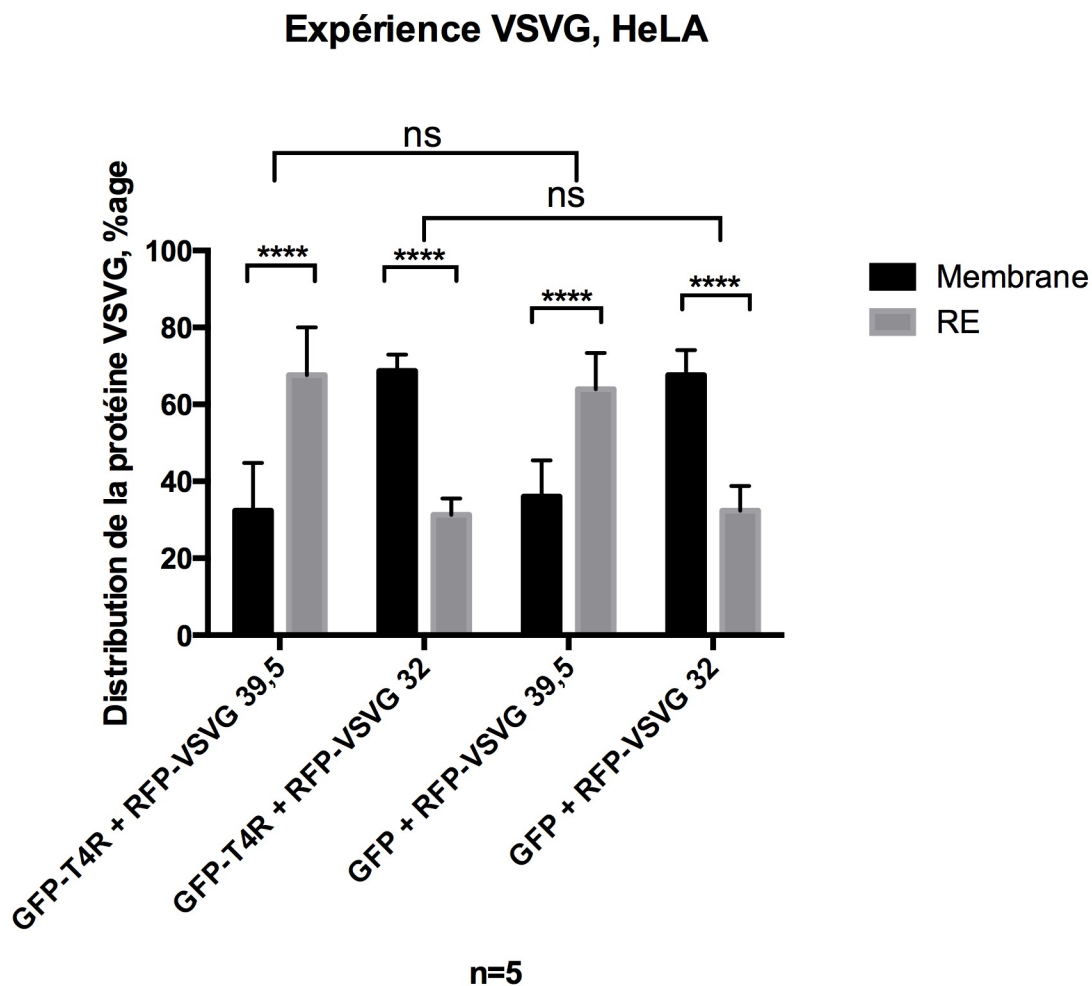


Figure 32. Distribution de la protéine RFP-VSVG dans un cas de surexpression de Tau
 Représentation de la distribution de la protéine VSVG suite à la surexpression de Tau et en fonction de la température, comparativement aux conditions sans surexpression. La surexpression de Tau ne semble pas avoir d'impact significatif sur la distribution de la protéine VSVG entre la membrane et le RE. (Two-way ANOVA, Test Tukey, +/- SEM P value < 0,0001 pour ****).

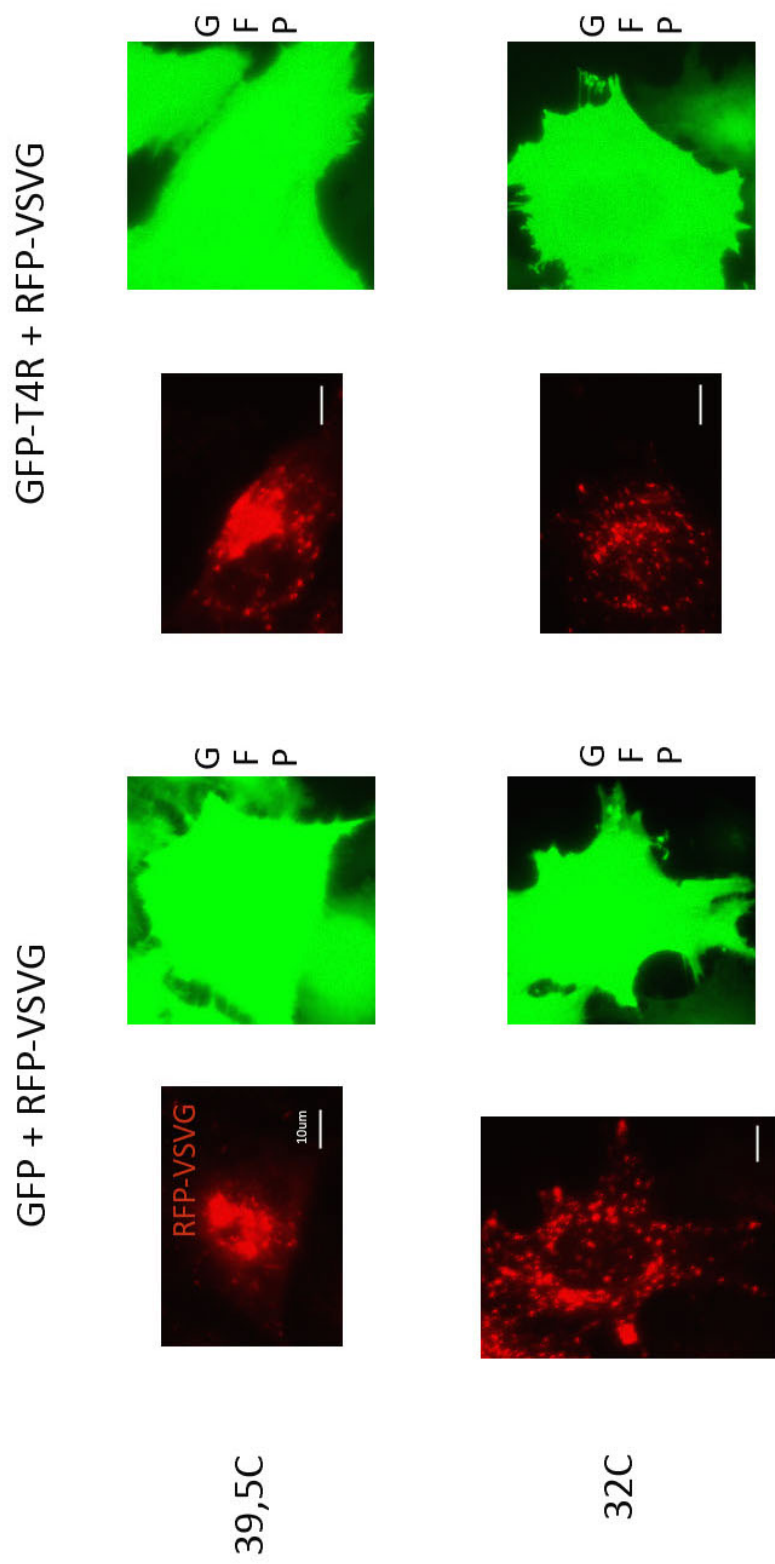


Figure 33. Distribution de la protéine VSVG selon la température

Illustration de la distribution de la protéine VSVG (en rouge sur les images) au microscope à fluorescence, que l'on remarque très compacte au RE à la température haute de 39,5 degrés contre une forme beaucoup plus dispersée à la membrane à 32 degrés. Les constructions portant l'étiquette GFP, les cellules transfectées apparaissent en vert sur les images.

4. Discussion

4.1. Résumé des résultats

Pour résumer, nous avons observé que le mutant de Tau hyperphosphorylée GFP-E12 a induit une fragmentation de l'AG plus rapidement que le mutant de Tau hypophosphorylée GFP-A12. Nous avons également confirmé que la Tau hyperphosphorylée était plus sécrétée, que ce soit à 30h ou 48h post-transfection. Nous avons ensuite mené des expériences sur la capacité de la Tau extracellulaire à pouvoir induire une fragmentation Golgienne sur des cellules HeLa non-transfectées, ce qui s'est avéré être le cas de la Tau hyperphosphorylée extracellulaire. Nos résultats montrent que 24h de contact avec des cellules HeLa suffisent à la Tau hyperphosphorylée extracellulaire à induire une fragmentation de l'AG dans environ 40% des cellules. Cette fragmentation n'a pas été observée lorsque la Tau extracellulaire a été enlevée du milieu de culture. Cette observation nous a permis de confirmer que l'élément déclencheur de cette fragmentation des Golgi des cellules HeLa, était bien la Tau hyperphosphorylée extracellulaire. Par la suite nous nous sommes demandé si l'induction de la fragmentation Golgienne par cette Tau hyperphosphorylée extracellulaire était due à l'état de phosphorylation de cette Tau ou bien au fait qu'étant plus sécrétée elle était présente en plus grande quantité dans le milieu. Nos expériences de dilution du milieu ont mis en évidence une relation dose-dépendante de la réponse Golgienne à la Tau extracellulaire, des quantités moins importantes de Tau hyperphosphorylée extracellulaire induisant la fragmentation de l'AG dans un pourcentage plus faible de cellules. Tous nos résultats indiquent que c'est principalement la Tau extracellulaire qui induit la fragmentation golgienne. Nous avons ensuite voulu identifier le domaine de Tau impliqué dans la fragmentation du Golgi. Nos résultats ont révélé que la séquence de Tau qui induit la fragmentation du Golgi se trouve dans une forme tronquée de Tau qui contient le MTBD. Cette observation pouvait indiquer que la Tau intracellulaire aussi contribuait à la fragmentation du Golgi en modifiant le réseau microtubulaire. Nous avons donc examiné si l'effet de Tau sur le Golgi impliquait sa liaison aux MTs. Aucun changement n'a été observé au niveau des MTs. Ceci indique que l'effet de Tau sur le Golgi n'implique pas une modification au niveau des MTs. La Tau intracellulaire ne semble donc pas être responsable du phénomène de fragmentation Golgienne. Enfin, nous tenions à vérifier si la

fragmentation altérerait le transport protéique à travers le Golgi. Nous l'avons donc testé à l'aide de la protéine RFP-VSVG, dont le transport n'a pas été modifié par la surexpression de GFP-T4R. Ceci nous indiquait que malgré sa fragmentation, l'AG restait fonctionnel.

4.2. La Tau hyperphosphorylée induit plus rapidement une fragmentation Golgienne

Nos résultats ont révélé que seulement le mutant de Tau hyperphosphorylée a provoqué une fragmentation du Golgi importante dès 30h post-transfection. Très récemment, une étude sur des échantillons humains du néocortex temporal et de l'hippocampe de patients Alzheimer a démontré que 65% des neurones qui contenaient de la Tau hyperphosphorylée et agrégée (NFTs) présentaient un Golgi fragmenté alors que seulement 6% des neurones sans NFTs présentaient une fragmentation de l'AG (Antón-Fernández et al. 2017). Si cette étude fait le lien entre la présence d'agrégats de Tau hyperphosphorylée et la fragmentation Golgienne, elle est supportée par des études antérieures qui ont rapporté une corrélation entre l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau et la fragmentation de l'AG dans un modèle de souris transgénique de Tau (Lin et al. 2003; Liazoghli et al. 2005). De plus, l'existence d'une relation entre la Tau hyperphosphorylée et la fragmentation Golgienne a également été décrite chez un patient ne présentant pas de démence, décédé à 45 ans d'un cancer des poumons (Antón-Fernández et al. 2017). Chez ce patient, l'équipe du Dr Munoz a observé un nombre important de neurones dans différentes régions cérébrales (cortex frontal, préfrontal et temporal) présentant des inclusions intracellulaires de Tau hyperphosphorylée et agrégée mais aucunes plaques séniles. La grande majorité de ces neurones avaient un AG fragmenté. Les résultats dans les cerveaux de patients, de souris transgéniques et nos résultats dans les cellules HeLa ont mis en lumière un lien entre la Tau hyperphosphorylée et la fragmentation de l'AG. Cependant, si il semble y avoir un lien entre la phosphorylation de Tau et la fragmentation Golgienne, nos expériences sur la Tau extracellulaire laissent à penser que la phosphorylation jouerait un rôle secondaire dans le processus de fragmentation, ce qu'il faudra confirmer dans l'avenir.

Concernant l'utilisation du marqueur cis-Golgien GM130, il est utilisé par le groupe de Catherine Rabouille pour l'étude de la fragmentation du Golgi en conditions de neurodégénérescence, comme dans une étude de référence (Bellouze et al. 2014) pour observer la morphologie Golgienne et est considéré comme un indicateur morphologique global du Golgi. De plus, le laboratoire a déjà observé qu'un marqueur trans-Golgien (TGN48) et un marqueur du Golgi médian (MG160) donnaient le même pattern de fragmentation que celui indiqué par GM130 (Liazoghli et al. 2005). Cependant, il serait intéressant dans l'avenir d'utiliser d'autres marqueurs Golgiens afin de confirmer que toutes les régions de l'AG sont bien fragmentées.

4.3. Contribution de la Tau extracellulaire à la fragmentation de l'AG

Pour nos études sur la Tau extracellulaire, nous avons confirmé que la Tau hyperphosphorylée était la forme de Tau la plus sécrétée à 30h et 48h post-transfection (Plouffe et al. 2012). En effet, la quantité de Tau présente dans le milieu extracellulaire étant nettement supérieure suite à la transfection avec GFP-E12 par rapport à la transfection avec GFP-T4R et GFP-A12. Ces résultats corrélaient avec l'augmentation de Tau dans le liquide céphalo-rachidien des patients Alzheimer au cours de la progression de la pathologie de Tau, qui corrélaient avec l'accumulation de la Tau hyperphosphorylée (Heiko Braak et al. 2011).

Ces résultats indiquaient que l'hyperphosphorylation et/ou la plus grande quantité de la Tau hyperphosphorylée dans le milieu pouvaient être responsable de l'induction de la fragmentation du Golgi. Nous avons donc procédé à des dilutions du milieu qui contenait le mutant GFP-E12 et nous avons appliqué ce milieu dilué sur des cellules HeLa non-transfectées durant 24h. Au cours de cette expérience, nous avons observé une diminution du nombre de cellules au Golgi fragmenté (figure 26). En effet, si le milieu non dilué induisait la fragmentation du Golgi de 40% des cellules, lorsque ce milieu a été dilué à 2/8 alors la fragmentation Golgienne n'était plus observable que dans 15% des cellules. Ce résultat a mis en lumière une relation dose-dépendante entre la quantité de Tau extracellulaire et la

fragmentation de l'AG. Nos résultats font effectivement penser que la transfection avec GFP-E12 produit plus de Tau dans le milieu extracellulaire et que c'est le fait que cette Tau soit présente en grande quantité qui induit la fragmentation des AG. Une vérification intéressante serait donc de mettre en contact des cellules HeLa non transfectées avec la même quantité de Tau extracellulaire provenant de cellules transfectées GFP-T4R, GFP-A12 et GFP-E12 afin de vérifier si la phosphorylation de Tau joue un rôle important dans l'induction de la fragmentation Golgienne. Il faudra pour cela mesurer la quantité de Tau extracellulaire avant d'appliquer le milieu sur les cellules afin d'être sûr qu'elle soit identique pour chacune des formes de Tau. Ces résultats et nos résultats antérieurs nous portent à croire que Tau4R, et A12 pourraient également induire une fragmentation du Golgi si elles étaient appliquées à une concentration similaire à celle de E12. En effet, dans une étude antérieure, nous avons démontré que la Tau qui est sécrétée subit une déphosphorylation pendant son transport dans la voie de sécrétion. Ceci résulte en une accumulation extracellulaire de Tau déphosphorylée. Finalement, pour démontrer de façon définitive que la Tau extracellulaire est la seule responsable pour l'induction de la fragmentation du Golgi, il faudrait la séquestrer dès que sa sécrétion commence. Ceci pourrait être fait en ajoutant l'anticorps dirigé contre Tau au milieu culture.

Nos résultats tendent à désigner la Tau extracellulaire comme responsable de la fragmentation Golgienne. Dans ce contexte, nous avons voulu comparer le pourcentage de cellules qui présentaient un Golgi fragmenté lorsque les cellules non transfectées étaient incubées dans un milieu qui contenait de la Tau avec le pourcentage lorsque les cellules HeLa étaient transfectées avec la Tau. Si les pourcentages étaient identiques, ceci indiquerait que la Tau extracellulaire présente dans les deux conditions était responsable de la fragmentation. Alors que la surexpression de GFP-T4R et GFP-A12 induisait la fragmentation de l'AG dans environ 15% des cellules 30h post-transfection, l'incubation des cellules HeLa non-transfectées dans du milieu qui contenait la GFP-T4R ou GFP-A12 Tau entraînait la fragmentation Golgienne d'environ 10% des cellules. Pour ce qui est du mutant GFP-E12, sa surexpression induisait la fragmentation du Golgi dans environ 30% des HeLa alors que l'incubation des cellules HeLa non-transfectées dans du milieu qui contenait ce mutant entraînait la fragmentation Golgienne d'environ 40% des cellules. La surexpression de la GFP

seule induisait quant à elle la fragmentation d'environ 20% des Golgi 30h après sa transfection, contre environ 10% lorsque des cellules HeLa non-transfectées étaient incubées dans du milieu qui la contenait. Le fait que les pourcentages soient semblables dans les cellules qui surexpriment les différentes formes de Tau et les cellules non-transfectées qui sont incubées dans un milieu qui contient ces différentes formes nous laissent croire que la fragmentation observée lors de la surexpression des différentes formes de Tau 30h post-transfection est due à la Tau extracellulaire. Ceci semble être le cas pour GFP-E12 mais pas pour GFP-A12 qui n'a pas induit de fragmentation lors des expériences sur la Tau extracellulaire. Ce résultat était surprenant puisque nous avons utilisé du milieu 48h post-transfection, un temps auquel GFP-A12 induisait une fragmentation lorsque ce mutant était surexprimé. Cependant, dans les expériences sur la Tau extracellulaire, les cellules ont été incubées avec le milieu qui contenait Tau seulement pendant 24h. Ceci nous indique que le temps d'incubation pourrait être un facteur important dans l'induction de la fragmentation Golgienne par la Tau extracellulaire. Dans le cas de GFP-A12, une incubation de 48h pourrait être requise.

4.4. Voies de signalisation activées par la Tau extracellulaire qui pourraient induire la fragmentation du Golgi

Des études antérieures ont rapporté que la Tau extracellulaire peut se lier aux récepteurs muscariniques M3. L'activation de ces récepteurs pourrait être responsable de la fragmentation du Golgi induite par Tau extracellulaire. En effet, il a été démontré que l'activation des récepteurs M3 provoque la translocation d'un complexe formé des sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G aux membranes Golgiennes (Saini et al. 2010). Cette translocation induit une fragmentation du Golgi. Cette possibilité sera examinée au cours des prochains mois. De plus, nous pourrions investiguer si la Tau extracellulaire conduit à l'activation des kinases PKD et JNKs qui phosphorylent les protéines GRASPs impliquées dans le maintien de la morphologie du Golgi. En effet, leur phosphorylation conduit à un clivage des saccules Golgiennes. Les kinases cdk1 et PIK-1 aussi phosphorylent les GRASPs. Dans ce cas, leur phosphorylation résulte en un désassemblage et une vésiculation des saccules Golgiennes. À la

lumière de ces données, il se pourrait que la Tau extracellulaire active plus qu'une de ces voies de signalisation puisque nous observons un clivage, désassemblage et une vésiculation des saccules Golgiennes.

4.5. Suivi temporel de la fragmentation du Golgi induite par Tau

Nous avons observé que le mutant GFP-E12 induisait une fragmentation à 30h post-transfection alors que la fragmentation induite par le mutant GFP-A12 se produisait à 48h post-transfection. À l'inverse, les cellules exprimant le mutant GFP-E12 présentaient un Golgi compact à 48h post-transfection alors que les cellules qui exprimaient le mutant GFP-A12 présentaient un Golgi compact à 30h post-transfection. Ces résultats indiquent que le Golgi est dynamique en présence de Tau. Il serait intéressant, suite à la surexpression de GFP-E12 et GFP-A12, d'effectuer un suivi temporel de la morphologie de l'AG. D'une part, ceci nous permettrait d'apporter plus de précision à nos résultats et de pouvoir ainsi observer les phénomènes de fragmentation et de recompaction Golgienne dans le temps et en fonction du niveau de phosphorylation et d'expression de Tau. D'autre part, l'étude d'un profil morphologique de la sorte nous permettrait d'étudier ces résultats au regard du cycle cellulaire, que l'on sait responsable de phénomènes de fragmentation et recompaction de l'AG (Ramirez and Lowe 2009; Lowe et al. 1998; A. R. Prescott et al. 2001; Morohashi et al. 2010; Lucocq and Warren 1987; Corda et al. 2012; Preuss et al. 1992; Cha and Shapiro 2001; Lowe, Gonatas, and Warren 2000; Misteli 1996; Tang, Yuan, and Wang 2010). En effet, dans le cycle cellulaire classique des cellules HeLa, l'AG est fragmenté au moment de la métaphase puis se réassemble au moment de la télophase (Lucocq and Warren 1987). La séquence mitotique allant de la prophase, métaphase, anaphase, télophase, cela veut dire que lors de la mitose l'AG est compact au moment de la prophase et à la fin de la télophase, et qu'il est fragmenté durant la métaphase et l'anaphase. Le cycle cellulaire des cellules HeLa durant une vingtaine d'heures, il faut donc être prudent quant à l'interprétation des phénomènes de fragmentation de l'AG qui pourraient également être influencés par le cycle cellulaire et non pas seulement par l'expression de Tau, si ils sont par exemple observés au moment de

l'anaphase. Ce genre de paramètres devrait être pris en considération dans des expériences futures. Par exemple, il serait important de synchroniser les cellules à une phase précise du cycle cellulaire afin de minimiser les effets causés par le cycle cellulaire. De plus, nous allons examiner si les kinases qui sont impliquées dans la fragmentation de Golgi au cours du cycle cellulaire sont également responsables de la fragmentation induite par Tau.

4.6. Contribution de la Tau intracellulaire à la fragmentation de l'AG

Bien que tous nos résultats nous portent à croire que la fragmentation est induite par la Tau extracellulaire, nous ne pouvons pas exclure de façon définitive la contribution de la Tau intracellulaire à ce phénomène. Ceci pourrait être le cas du mutant GFP-A12 qui n'a pas induit de fragmentation lorsqu'il a été appliqué en extracellulaire alors que nous avons observé une fragmentation lors de sa surexpression. Si la surexpression de Tau induit une fragmentation Golgienne, nos résultats montrent que c'est la surexpression de Tau hyperphosphorylée qui semble induire le plus rapidement une telle fragmentation. Nous savons que la Tau interagit avec les membranes Golgiennes et régule leur association avec les MTs (Farah et al. 2006). Notre étude antérieure a montré qu'il y avait une augmentation d'interaction de la Tau hyperphosphorylée avec les membranes golgiennes dans le cerveau de patients Alzheimer (Perreault et al.'2009). Il se pourrait donc que la Tau hyperphosphorylée interagissant de façon plus importante avec les membranes du Golgi entraîne leur fragmentation. Selon nos présents résultats, cette interaction se ferait peut être également plus rapidement avec la Tau hyperphosphorylée d'où une fragmentation observée plus tôt suite à la transfection.

De plus, nous avons également investigué l'importance de la liaison aux MTs pour la fragmentation Golgienne, à l'aide de formes tronquées de Tau qui correspondaient soit à son domaine N-terminal ou son domaine C-terminal qui contenait le MTBD. Si la surexpression de GFP-T4R et GFP-Nt a causé une fragmentation de l'AG semblable (environ 20% des cellules), la surexpression de GFP-Ct a entraîné la fragmentation Golgienne d'environ 45% des HeLa. Ce résultat surprenant nous indique que le domaine N-terminal pourrait avoir un

effet inhibiteur sur la capacité de Tau à induire une fragmentation du Golgi. Par exemple, il se peut que le MTBD favorise une telle fragmentation mais qu'il lui faille être disponible et plus accessible pour cela, ce qui est le cas lorsque le N-terminal est absent. On sait également qu'il existe des interactions fonctionnelles entre le domaine riche en proline du fragment N-terminal et les répétitions du MTBD en C-terminal (Goode et al. 1997). Ces interactions engendrent une association plus stable de Tau avec les MTs. Le domaine C-terminal seul pourrait donc promouvoir une interaction plus faible de Tau avec les MTs qui pourrait diminuer leur stabilité qui aurait pour conséquence la fragmentation Golgienne que nous avons observé lors de sa surexpression.

Nous nous sommes également demandé si l'effet du fragment Cterm de Tau sur la fragmentation Golgienne ne résultait pas en un changement de stabilité des MTs suite à une altération des modifications post-traductionnelles de la tubuline. Nous avons donc examiné les niveaux d'acétylation et de tyrosylation de l' α -tubuline des MTs, plusieurs études rapportant le fait qu'une détyrosylation de la tubuline rend les MTs moins dynamiques et donc plus stables tout comme l'acétylation de l' α -tubuline, contrairement à la tyrosylation qui tend à déstabiliser les MTs et donc à favoriser la fragmentation de l'AG (MacRae 1997; Yoshiyama et al. 2003; Bulinski, Gundersen, and Webster 1987; Webster et al. 1987; Gundersen, Kalnoski, and Bulinski 1984; Kreis 1987; Skoufias, Burgess, and Wilson 1990; Bellouze et al. 2014; Drechsel et al. 1992). Nos résultats n'indiquent aucune différence statistique en terme de tubuline acétylée ou tyrosylée au niveau des MTs, aussi bien suite à la surexpression de GFP-T4R, GFP-E12, GFP-A12 que GFP-Nt et GFP-Ct. Ces résultats peuvent constituer un autre indice qui écarte la Tau intracellulaire comme responsable de la fragmentation Golgienne. Cependant, il sera important dans le futur de vérifier si la phosphorylation influence l'effet du domaine MTBD sur la fragmentation de l'AG.

Finalement, nos expériences ne nous ont pas permis de déterminer si c'est le C-terminal intracellulaire ou extracellulaire qui induit la fragmentation du Golgi. En effet, le C-terminal est sécrété par les cellules HeLa. Le pourcentage de cellules présentant un Golgi fragmenté suite à la surexpression du C-terminal est très similaire à celui induit par GFP-E12. Il serait intéressant de vérifier si son niveau de sécrétion est similaire à celui de GFP-E12.

4.7. Vérification de la fonctionnalité de l'AG

Afin de vérifier si la fragmentation de l'AG induite par Tau avait un effet sur sa fonction, nous avons suivi le transport de la protéine VSVG du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique. Toutefois, nous nous sommes heurtés à une difficulté de pouvoir simultanément étudier la morphologie de l'AG et la localisation de la protéine VSVG dans des cellules qui surexprimaient la Tau. Pour que ceci soit possible, nous aurions du utiliser une protéine golgienne marquée par un tag fluorescent plutôt que d'utiliser un anticorps pour visualiser la morphologie du Golgi. Nous avons donc simplement examiné la distribution de VSVG dans des cellules qui surexprimaient la Tau humaine sans confirmer que le Golgi était fragmenté. Dans toutes les cellules qui ont été examinées, aucun changement de distribution de la protéine VSVG n'a été observé. Un tel résultat indique que la surexpression de GFP-T4R, n'a pas altéré le fonctionnement du Golgi. Cependant, il est important de noter que le taux de fragmentation du Golgi induit par la GFP-T4R est similaire à celui induit par l'expression de la GFP seule. Ceci indique que la fragmentation n'est pas causée par la Tau mais bien par la transfection. Il serait intéressant de vérifier si la transport de VSVG est affecté par la surexpression de GFP-E12 que l'on sait capable d'induire une fragmentation rapide et importante du Golgi. Concernant notre cas de figure, l'idéal resterait de pouvoir observer la distribution de la protéine VSVG sur une cellule tout en ayant accès la morphologie de son Golgi, ce qui nous permettrait d'affirmer que le Golgi reste fonctionnel même en cas de fragmentation. Finalement, il serait intéressant de tester le transport d'autres protéines ou d'autres fonctions Golgiennes comme l'adressage des protéines en situation de fragmentation du Golgi induite par Tau.

4.8. Contribution de la fragmentation du Golgi induite par la Tau extracellulaire dans la propagation de Tau dans le cerveau

Le fait que la Tau extracellulaire puisse induire une fragmentation Golgienne sur d'autres cellules est cohérent avec la théorie de propagation de cellule à cellule de la pathologie de Tau (Mohamed et al. 2013; Clavaguera et al. 2009). Une étude récente indique que la fragmentation de l'AG induite par la Tau extracellulaire pourrait déclencher la pathologie de Tau. En effet, les auteurs de cette étude ont démontré que l'induction d'une fragmentation du Golgi suite à la suppression de la protéine Golgin-84 impliquée dans la formation des saccules golgiennes (Diao et al. 2003) induit l'hyperphosphorylation de Tau (Jiang et al. 2014). L'hyperphosphorylation de Tau résulterait de l'activation des kinases CDK5 et ERK. Cette, corrélation était de plus en plus étroite avec le vieillissement des animaux (Jiang et al. 2014). Selon ces observations, il est possible d'établir une cascade d'évènements qui pourraient conduire à l'élaboration d'un cercle vicieux entre la Tau extracellulaire et la fragmentation Golgienne. Ainsi, la Tau extracellulaire induirait une fragmentation du Golgi dans les neurones avoisinants qui conduirait à l'hyperphosphorylation de Tau et à l'augmentation de sécrétion de Tau par ces neurones. Si c'est bien la Tau sécrétée qui est à l'origine de la fragmentation de l'AG, il serait intéressant d'en bloquer la sécrétion afin d'observer si il se produit une fragmentation du Golgi. Nous travaillons actuellement sur l'identification de la voie de sécrétion de Tau, qu'il est nécessaire de connaître pour une telle expérience, afin de pouvoir par l'avenir répondre à cette question.

4.9. Avantages et limitations du modèle cellulaire

Dans le cadre de nos expériences, nous avons choisi les cellules HeLa pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les cellules HeLa sont beaucoup plus faciles à manipuler que les neurones (ex. plus faciles à transfecter). Cependant, la raison majeure de notre choix est que plusieurs phénomènes que nous avons observés dans les neurones ont également été observés dans les cellules HeLa suite à la surexpression de Tau. Premièrement, comme noté dans les neurones, nous observons une fragmentation du Golgi suite à la surexpression de Tau. Deuxièmement, les cellules HeLa peuvent sécréter la Tau comme les neurones le font. La Tau sécrétée par les HeLa partage plusieurs similitudes avec la Tau sécrétée par les neurones : a) elle est hypophosphorylée, b) elle est principalement libre et donc pas contenue dans des vésicules et c) elle est sécrétée par une voie non-conventionnelle. Finalement, les cellules HeLa sont d'origine humaine ce qui en fait un modèle *in vitro* idéal pour l'étude des pathologies humaines. Enfin, si il est possible d'étudier spécifiquement la Tau humaine dans les cellules HeLa par surexpression, cela ne traduit pas un contexte physiologique comme c'est le cas dans les neurones, qui demeurent le modèle le plus rigoureux concernant l'étude des neuropathologies.

4.10. Perspectives futures

Nous avons établi un lien entre la quantité de Tau extracellulaire et la fragmentation Golgienne. Il sera nécessaire dans les années à venir d'identifier les mécanismes à l'origine de ce lien. Par exemple, il serait intéressant d'identifier la voie de signalisation qui est activée par la Tau extracellulaire qui conduit à la fragmentation golgienne. Il faudra également réussir à déterminer si il existe un seuil en terme de quantité de Tau extracellulaire qui est nécessaire au déclenchement du processus de fragmentation de l'AG. Dans un but plus thérapeutique, il serait intéressant d'effectuer des expériences permettant de définir si l'on peut observer une recompaction Golgienne par la diminution de la quantité de Tau extracellulaire, et si dans les souris transgéniques qui récapitulent la pathologie de Tau une telle diminution de la Tau extracellulaire conduirait à des améliorations cognitives.

La capacité de la Tau extracellulaire à induire la fragmentation du Golgi d'autres cellules n'est pas sans rappeler la théorie de propagation de la pathologie de Tau dans le cerveau (Jucker and Walker 2013; Vingtdeux, Sergeant, and Buée 2012). Cette théorie de propagation pourrait donc être amené à s'élargir, n'englobant plus seulement la capacité de Tau extracellulaire à induire l'agrégation de la protéine Tau intracellulaire correctement repliée lors son endocytose par un neurone avoisinant, mais également la capacité de la Tau extracellulaire à induire la fragmentation de Golgi d'autres neurones, jusqu'alors compacts. Cette fragmentation conduirait à une augmentation de la sécrétion de Tau qui à son tour induirait une fragmentation du Golgi dans le neurone suivant.

Enfin, rappelons que dans la MA l'accumulation extracellulaire du peptide A β conduit à la fragmentation de l'AG qui à son tour induit une augmentation de production et de sécrétion du même peptide (Joshi et al. 2014). Nos résultats montrent que la sécrétion de Tau augmente également la fragmentation de l'AG. L'étude de la MA via le prisme de l'AG pourrait donc réconcilier les recherches menées le plus souvent séparément sur la protéine Tau et sur le peptide A β , alors que les deux pathologies (Tau et amyloïdes) sont présentes chez les patients Alzheimer. Si la tâche à mener avant la compréhension complète de la MA demeure grande, avoir des mécanismes et organelles communs aux pathologies Tau et amyloïdes pourrait permettre une approche plus globale de la maladie.

4.11. Conclusion

Notre étude a permis d'identifier la Tau responsable de la fragmentation Golgienne comme étant la Tau extracellulaire. Nos résultats antérieurs ont montré que l'hyperphosphorylation de Tau tel qu'observé dans la MA conduit à sa plus grande sécrétion. La Tau hyperphosphorylée qui est sécrétée en plus grande quantité, induirait une fragmentation du Golgi dans les cellules avoisinantes. Une étude récente a montré que la fragmentation du Golgi peut activer des kinases comme CDK5 et GSK3 menant à l'hyperphosphorylation de la Tau intracellulaire (Jiang et al. 2014; Singh et al. 1995). Nous proposons alors l'installation d'un cercle vicieux où l'hyperphosphorylation de Tau augmenterait sa sécrétion qui induirait une fragmentation du Golgi qui à son tour activerait des kinases impliquées dans l'hyperphosphorylation de Tau (figure 34). Cette proposition pourrait être utilisée pour l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques visant à endiguer la propagation de la pathologie de Tau, en ciblant par exemple l'AG ou bien la Tau extracellulaire qui est facilement accessible.

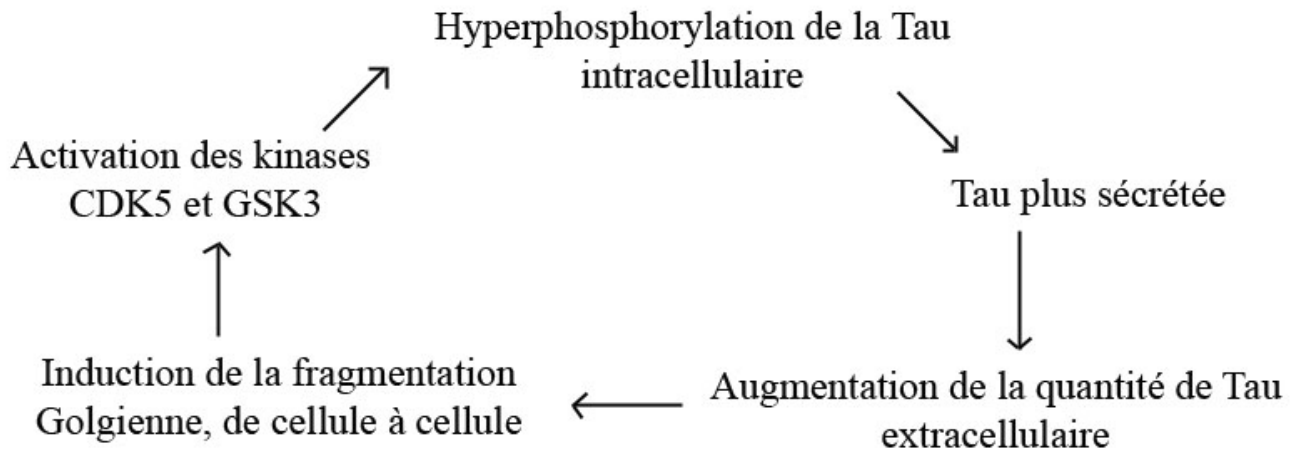


Figure 34. Schéma récapitulatif du cercle vicieux hypothétique de fragmentation Golgienne concernant la pathologie de Tau

Figures supplémentaires

Figure 1

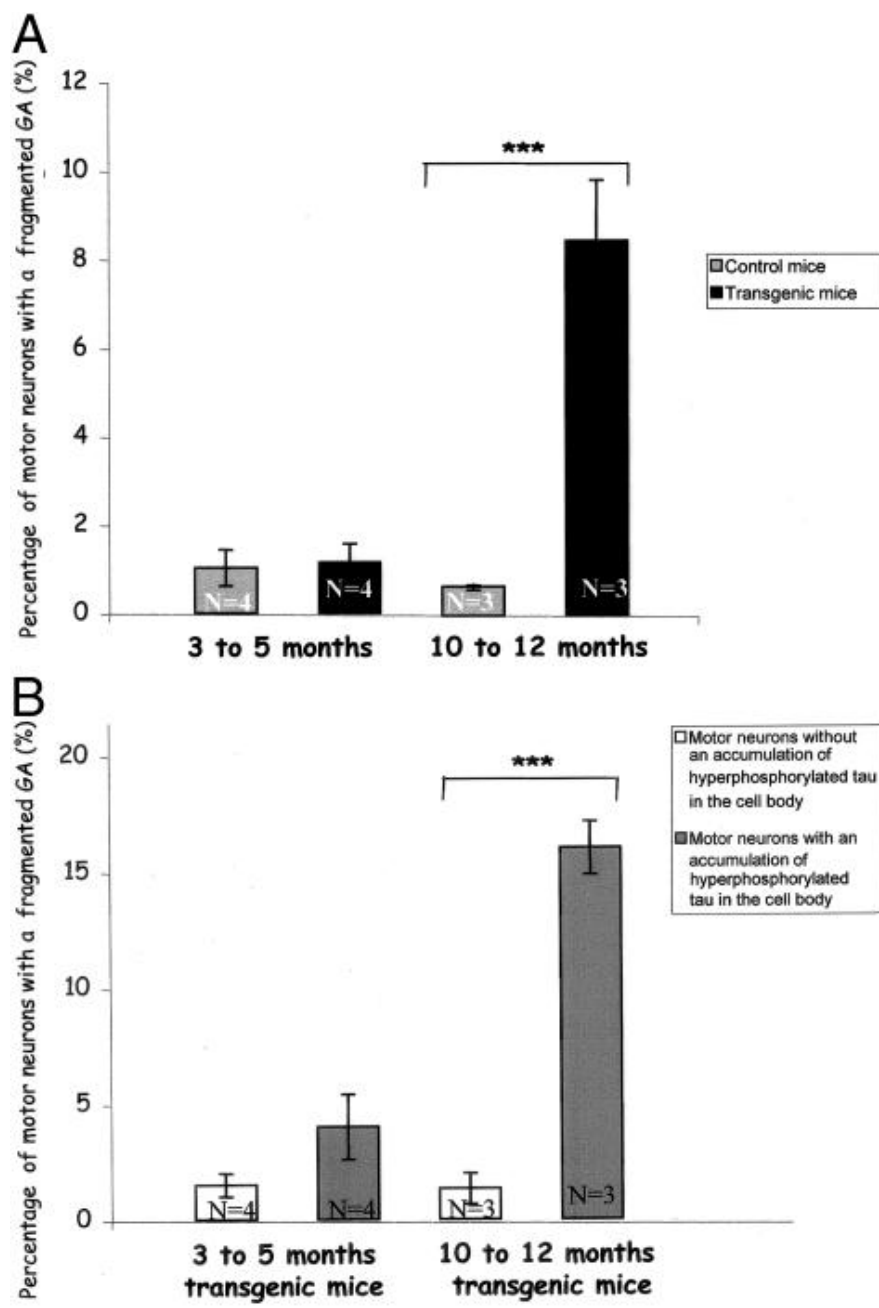


Figure issue du papier de 2005 « Fragmentation of the Golgi Apparatus Induced by the Overexpression of Wild-Type and Mutant Human Tau Forms in Neurons » de Dalinda Liazoghli et Nicole Leclerc. La figure traduit le pourcentage de neurones qui présentent un

Golgi fragmenté dans les neurones moteurs de souris témoins et e souris JNPL3. Pour les souris jeunes entre 3 et 5 mois on observe que la différence entre la population témoins et la population JNPL3 en terme de fragmentation Golgienne n'est pas significative, ce qui va dans le sens du modèle murin ou l'âge est un facteur clef dans le développement des symtômes et observations cellulaires caractéristiques JNPL3. Pour les souris plus âgées en revanche, environ 8 à 10% des neurones moteurs des souris JNPL3 présentent une fragmentation Golgienne contre moins de 1% des souris témoins. Les résultats des expériences présentées dans ce mémoire ne sont pas fait dans un modèle murin *in vivo* mais *in vitro* dans des cellules HeLa. Cependant, les neurones moteurs du modèle murin JNPL3 exprimant le mutant P301L présentent, tout comme notre mutant GFP-E12 (exemple, figure 17) plus de fragmentation Golgienne, dans plus de cellules. Cependant il sagit là d'un parallèle et non d'une symétrie, entre des résultats de neurones moteurs de modèle murin *in vivo* et de cellules HeLa en culture.

Bibliographie

Abraha, A., N. Ghoshal, T. C. Gamblin, V. Cryns, R. W. Berry, J. Kuret, and L. I. Binder. 2000. "C-Terminal Inhibition of Tau Assembly in Vitro and in Alzheimer's Disease." *Journal of Cell Science* 113 Pt 21 (November): 3737–45.

Al-Bassam, Jawdat, Rachel S. Ozer, Daniel Safer, Shelley Halpain, and Ronald A. Milligan. 2002. "MAP2 and Tau Bind Longitudinally along the Outer Ridges of Microtubule Protofilaments." *The Journal of Cell Biology* 157 (7): 1187–96. doi:10.1083/jcb.200201048.

Alfalah, M., R. Jacob, U. Preuss, K. P. Zimmer, H. Naim, and H. Y. Naim. 1999. "O-Linked Glycans Mediate Apical Sorting of Human Intestinal Sucrase-Isomaltase through Association with Lipid Rafts." *Current Biology: CB* 9 (11): 593–96.

Alonso, A. C., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1996. "Alzheimer's Disease Hyperphosphorylated Tau Sequesters Normal Tau into Tangles of Filaments and Disassembles Microtubules." *Nature Medicine* 2 (7): 783–87.

Alonso, A., T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 2001. "Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Straight Filaments." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6923–28. doi:10.1073/pnas.121119298.

Alvarez-Miranda, Eduardo A., Markus Sinnl, and Hesso Farhan. 2015. "Alteration of Golgi Structure by Stress: A Link to Neurodegeneration?" *Frontiers in Neuroscience* 9 (November). doi:10.3389/fnins.2015.00435.

Alzheimer, A. 1991. "A Contribution Concerning the Pathological Anatomy of Mental Disturbances in Old Age, 1899." *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 5 (2): 69–70.

Alzheimer, A., H. Förstl, and R. Levy. 1991. "On Certain Peculiar Diseases of Old Age." *History of Psychiatry* 2 (5 Pt 1): 71–101.

Andreadis, A., W. M. Brown, and K. S. Kosik. 1992. "Structure and Novel Exons of the Human Tau Gene." *Biochemistry* 31 (43): 10626–33.

Andrei, C., C. Dazzi, L. Lotti, M. R. Torrisi, G. Chimini, and A. Rubartelli. 1999. "The Secretory Route of the Leaderless Protein Interleukin 1beta Involves Exocytosis of Endolysosome-Related Vesicles." *Molecular Biology of the Cell* 10 (5): 1463–75.

Antón-Fernández, Alejandro, Guillermo Aparicio-Torres, Silvia Tapia, Javier

DeFelipe, and Alberto Muñoz. 2017. “Morphometric Alterations of Golgi Apparatus in Alzheimer’s Disease Are Related to Tau Hyperphosphorylation.” *Neurobiology of Disease* 97 (January): 11–23. doi:10.1016/j.nbd.2016.10.005.

Aronov, S., G. Aranda, L. Behar, and I. Ginzburg. 2001. “Axonal Tau mRNA Localization Coincides with Tau Protein in Living Neuronal Cells and Depends on Axonal Targeting Signal.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (17): 6577–87.

Aronov, Stella, Gonzalo Aranda, Leah Behar, and Irith Ginzburg. 2002. “Visualization of Translated Tau Protein in the Axons of Neuronal P19 Cells and Characterization of Tau RNP Granules.” *Journal of Cell Science* 115 (Pt 19): 3817–27.

Atkin, Julie D., Manal A. Farg, Kai Ying Soo, Adam K. Walker, Mark Halloran, Bradley J. Turner, Phillip Nagley, and Malcolm K. Horne. 2014. “Mutant SOD1 Inhibits ER-Golgi Transport in Amyotrophic Lateral Sclerosis.” *Journal of Neurochemistry* 129 (1): 190–204. doi:10.1111/jnc.12493.

Avila, J. 2008. “Tau Kinases and Phosphatases.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (1): 258–59. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00214.x.

Avila, Jesus, Jose J. Lucas, Mar Perez, and Felix Hernandez. 2004. “Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions.” *Physiological Reviews* 84 (2): 361–84. doi:10.1152/physrev.00024.2003.

Bahr, Ben A., Babak Abai, Christine M. Gall, Peter W. Vanderklish, Keith B. Hoffman, and Gary Lynch. 1994. “Induction of β -Amyloid-Containing Polypeptides in Hippocampus: Evidence for a Concomitant Loss of Synaptic Proteins and Interactions with an Excitotoxin.” *Experimental Neurology* 129 (1): 81–94. doi:10.1006/exnr.1994.1149.

Baloyannis, Stavros J. 2014. “Golgi Apparatus and Protein Trafficking in Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 42 Suppl 3: S153-162. doi:10.3233/JAD-132660.

Barra, H. S., C. A. Arce, J. A. Rodríguez, and R. Caputto. 1974. “Some Common Properties of the Protein That Incorporates Tyrosine as a Single Unit and the Microtubule Proteins.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 60 (4): 1384–90.

Barten, Donna M., Gregory W. Cadelina, Nina Hoque, Lynn B. DeCarr, Valerie L. Guss, Ling Yang, Sethu Sankaranarayanan, et al. 2011. “Tau Transgenic Mice as Models for

Cerebrospinal Fluid Tau Biomarkers.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 24 Suppl 2: 127–41. doi:10.3233/JAD-2011-110161.

Basurto-Islas, Gustavo, Jose Luna-Muñoz, Angela L. Guillozet-Bongaarts, Lester I. Binder, Raul Mena, and Francisco García-Sierra. 2008. “Accumulation of Aspartic acid421- and Glutamic acid391-Cleaved Tau in Neurofibrillary Tangles Correlates with Progression in Alzheimer Disease.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 67 (5): 470–83. doi:10.1097/NEN.0b013e31817275c7.

Bellouze, Sarah, Gilbert Baillat, Dorothée Buttigieg, Pierre de la Grange, Catherine Rabouille, and Georg Haase. 2016. “Stathmin 1/2-Triggered Microtubule Loss Mediates Golgi Fragmentation in Mutant SOD1 Motor Neurons.” *Molecular Neurodegeneration* 11 (1): 43. doi:10.1186/s13024-016-0111-6.

Bellouze, Sarah, Michael K. Schäfer, Dorothée Buttigieg, Gilbert Baillat, Catherine Rabouille, and Georg Haase. 2014. “Golgi Fragmentation in Pmn Mice Is due to a Defective ARF1/TBCE Cross-Talk That Coordinates COPI Vesicle Formation and Tubulin Polymerization.” *Human Molecular Genetics* 23 (22): 5961–75. doi:10.1093/hmg/ddu320.

Ben-Tekaya, Houchaima, Kota Miura, Rainer Pepperkok, and Hans-Peter Hauri. 2005. “Live Imaging of Bidirectional Traffic from the ERGIC.” *Journal of Cell Science* 118 (Pt 2): 357–67. doi:10.1242/jcs.01615.

Benting, J. H., A. G. Rietveld, and K. Simons. 1999. “N-Glycans Mediate the Apical Sorting of a GPI-Anchored, Raft-Associated Protein in Madin-Darby Canine Kidney Cells.” *The Journal of Cell Biology* 146 (2): 313–20.

Bentivoglio, M. 1999. “The Discovery of the Golgi Apparatus.” *Journal of the History of the Neurosciences* 8 (2): 202–8. doi:10.1076/jhin.8.2.202.1833.

Berg, T. O., M. Fengsrud, P. E. Strømhaug, T. Berg, and P. O. Seglen. 1998. “Isolation and Characterization of Rat Liver Amphisomes. Evidence for Fusion of Autophagosomes with Both Early and Late Endosomes.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (34): 21883–92.

Bhat, Aashiq Hussain, Khalid Bashir Dar, Suhail Anees, Mohammad Afzal Zargar, Akbar Masood, Manzoor Ahmad Sofi, and Showkat Ahmad Ganie. 2015. “Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Neurodegenerative Diseases; a Mechanistic Insight.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 74 (August): 101–10. doi:10.1016/j.biopha.2015.07.025.

Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1993.

“Phosphorylation of Ser262 Strongly Reduces Binding of Tau to Microtubules: Distinction between PHF-like Immunoreactivity and Microtubule Binding.” *Neuron* 11 (1): 153–63.

Binder, L. I., A. Frankfurter, and L. I. Rebhun. 1985. “The Distribution of Tau in the Mammalian Central Nervous System.” *The Journal of Cell Biology* 101 (4): 1371–78.

Black, J. D., S. T. Koury, R. B. Bankert, and E. A. Repasky. 1988. “Heterogeneity in Lymphocyte Spectrin Distribution: Ultrastructural Identification of a New Spectrin-Rich Cytoplasmic Structure.” *The Journal of Cell Biology* 106 (1): 97–109.

Black, M. M., T. Slaughter, S. Moshiah, M. Obrocka, and I. Fischer. 1996. “Tau Is Enriched on Dynamic Microtubules in the Distal Region of Growing Axons.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (11): 3601–19.

Bonifacino, Juan S, and Benjamin S Glick. 2004. “The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion.” *Cell* 116 (2): 153–66. doi:10.1016/S0092-8674(03)01079-1.

Bories, Cyril, Zoé Husson, Matthieu J. Guitton, and Yves De Koninck. 2013. “Differential Balance of Prefrontal Synaptic Activity in Successful versus Unsuccessful Cognitive Aging.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (4): 1344–56. doi:10.1523/JNEUROSCI.3258-12.2013.

Braak, H., and E. Braak. 1991. “Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes.” *Acta Neuropathologica* 82 (4): 239–59.

Braak, Heiko, Dietmar R. Thal, Estifanos Ghebremedhin, and Kelly Del Tredici. 2011. “Stages of the Pathologic Process in Alzheimer Disease: Age Categories from 1 to 100 Years.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 70 (11): 960–69. doi:10.1097/NEN.0b013e318232a379.

Brady, R. M., R. P. Zinkowski, and L. I. Binder. 1995. “Presence of Tau in Isolated Nuclei from Human Brain.” *Neurobiology of Aging* 16 (3): 479–86.

Bramblett, G. T., M. Goedert, R. Jakes, S. E. Merrick, J. Q. Trojanowski, and V. M. Lee. 1993. “Abnormal Tau Phosphorylation at Ser396 in Alzheimer’s Disease Recapitulates Development and Contributes to Reduced Microtubule Binding.” *Neuron* 10 (6): 1089–99.

Brandt, R., J. Léger, and G. Lee. 1995. “Interaction of Tau with the Neural Plasma Membrane Mediated by Tau’s Amino-Terminal Projection Domain.” *The Journal of Cell Biology* 131 (5): 1327–40.

Brion, J. P. 1999. “[Neurofibrillary tangles and early modification of the neuronal

cytoskeleton in Alzheimer's disease and in experimental models].” *Bulletin Et Memoires De l'Academie Royale De Medecine De Belgique* 154 (6 Pt 2): 287–94.

Brion, J. P., A. M. Couck, E. Passareiro, and J. Flament-Durand. 1985. “Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease: An Immunohistochemical Study.” *Journal of Submicroscopic Cytology* 17 (1): 89–96.

Brion, J. P., J. Flament-Durand, and P. Dustin. 1986. “Alzheimer's Disease and Tau Proteins.” *Lancet (London, England)* 2 (8515): 1098.

Brion, J. P., J. Guillemot, D. Couchie, J. Flament-Durand, and J. Nunez. 1988. “Both Adult and Juvenile Tau Microtubule-Associated Proteins Are Axon Specific in the Developing and Adult Rat Cerebellum.” *Neuroscience* 25 (1): 139–46.

Buée, L., T. Bussière, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, and P. R. Hof. 2000. “Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders.” *Brain Research. Brain Research Reviews* 33 (1): 95–130.

Bulinski, J. C., G. G. Gundersen, and D. R. Webster. 1987. “A Function for Tubulin Tyrosination?” *Nature* 328 (6132): 676. doi:10.1038/328676a0.

Burkhardt, J. K., C. J. Echeverri, T. Nilsson, and R. B. Vallee. 1997. “Overexpression of the Dynamitin (p50) Subunit of the Dynactin Complex Disrupts Dynein-Dependent Maintenance of Membrane Organelle Distribution.” *The Journal of Cell Biology* 139 (2): 469–84.

Butner, K. A., and M. W. Kirschner. 1991. “Tau Protein Binds to Microtubules through a Flexible Array of Distributed Weak Sites.” *The Journal of Cell Biology* 115 (3): 717–30.

Caceres, A., and K. S. Kosik. 1990. “Inhibition of Neurite Polarity by Tau Antisense Oligonucleotides in Primary Cerebellar Neurons.” *Nature* 343 (6257): 461–63. doi:10.1038/343461a0.

Caceres, A., S. Potrebic, and K. S. Kosik. 1991. “The Effect of Tau Antisense Oligonucleotides on Neurite Formation of Cultured Cerebellar Macroneurons.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 11 (6): 1515–23.

Calignon, Alix de, Manuela Polydoro, Marc Suárez-Calvet, Christopher William, David H. Adamowicz, Kathy J. Kopeikina, Rose Pitstick, et al. 2012. “Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease.” *Neuron* 73 (4): 685–97.

doi:10.1016/j.neuron.2011.11.033.

Carroll, K. S., J. Hanna, I. Simon, J. Krise, P. Barbero, and S. R. Pfeffer. 2001. "Role of Rab9 GTPase in Facilitating Receptor Recruitment by TIP47." *Science (New York, N.Y.)* 292 (5520): 1373–76. doi:10.1126/science.1056791.

Caviston, J. P., J. L. Ross, S. M. Antony, M. Tokito, and E. L. F. Holzbaur. 2007. "Huntingtin Facilitates Dynein/Dynactin-Mediated Vesicle Transport." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (24): 10045–50. doi:10.1073/pnas.0610628104.

Cha, H., and P. Shapiro. 2001. "Tyrosine-Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase Associates with the Golgi Complex during G2/M Phase of the Cell Cycle: Evidence for Regulation of Golgi Structure." *The Journal of Cell Biology* 153 (7): 1355–67.

Chabin-Brion, K., J. Marceiller, F. Perez, C. Settegrana, A. Drechou, G. Durand, and C. Pous. 2001. "The Golgi Complex Is a Microtubule-Organizing Organelle." *Molecular Biology of the Cell* 12 (7): 2047–60. doi:10.1091/mbc.12.7.2047.

Chen, J., Y. Kanai, N. J. Cowan, and N. Hirokawa. 1992. "Projection Domains of MAP2 and Tau Determine Spacings between Microtubules in Dendrites and Axons." *Nature* 360 (6405): 674–77. doi:10.1038/360674a0.

Chesser, Adrienne S., Susanne M. Pritchard, and Gail V. W. Johnson. 2013. "Tau Clearance Mechanisms and Their Possible Role in the Pathogenesis of Alzheimer Disease." *Frontiers in Neurology* 4 (September): 122. doi:10.3389/fneur.2013.00122.

Cho, H. J., J. Yu, C. Xie, P. Rudrabhatla, X. Chen, J. Wu, L. Parisiadou, et al. 2014. "Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Regulates Sec16A at ER Exit Sites to Allow ER-Golgi Export." *The EMBO Journal* 33 (20): 2314–31. doi:10.15252/embj.201487807.

Choy, Regina Wai-Yan, Zhiliang Cheng, and Randy Schekman. 2012. "Amyloid Precursor Protein (APP) Traffics from the Cell Surface via Endosomes for Amyloid β ($A\beta$) Production in the Trans-Golgi Network." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (30): E2077-2082. doi:10.1073/pnas.1208635109.

Cipriani, Gabriele, Cristina Dolciotti, Lucia Picchi, and Ubaldo Bonuccelli. 2011. "Alzheimer and His Disease: A Brief History." *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 32 (2): 275–79. doi:10.1007/s10072-010-0454-7.

Clark, L. N., P. Poorkaj, Z. Wszolek, D. H. Geschwind, Z. S. Nasreddine, B. Miller, D.

Li, et al. 1998. "Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido-Ponto-Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (22): 13103–7.

Clavaguera, Florence, Tristan Bolmont, R. Anthony Crowther, Dorothee Abramowski, Stephan Frank, Alphonse Probst, Graham Fraser, et al. 2009. "Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain." *Nature Cell Biology* 11 (7): 909–13. doi:10.1038/ncb1901.

Clavaguera, Florence, Fiona Grueninger, and Markus Tolnay. 2014. "Intercellular Transfer of Tau Aggregates and Spreading of Tau Pathology: Implications for Therapeutic Strategies." *Neuropharmacology* 76 Pt A (January): 9–15. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.037.

Clermont, Y., A. Rambourg, and L. Hermo. 1995. "Trans-Golgi Network (TGN) of Different Cell Types: Three-Dimensional Structural Characteristics and Variability." *The Anatomical Record* 242 (3): 289–301. doi:10.1002/ar.1092420302.

Clermont, Y., L. Xia, A. Rambourg, J. D. Turner, and L. Hermo. 1993. "Structure of the Golgi Apparatus in Stimulated and Nonstimulated Acinar Cells of Mammary Glands of the Rat." *The Anatomical Record* 237 (3): 308–17. doi:10.1002/ar.1092370303.

Climmer, Leslie K., Maxim Dobretsov, and Vladimir Lupashin. 2015. "Defects in the COG Complex and COG-Related Trafficking Regulators Affect Neuronal Golgi Function." *Frontiers in Neuroscience* 9 (October). doi:10.3389/fnins.2015.00405.

Colanzi, Antonino, and Christine Sütterlin. 2013. "Signaling at the Golgi during Mitosis." *Methods in Cell Biology* 118: 383–400. doi:10.1016/B978-0-12-417164-0.00023-9.

Cole, N. B., N. Sciaky, A. Marotta, J. Song, and J. Lippincott-Schwartz. 1996. "Golgi Dispersal during Microtubule Disruption: Regeneration of Golgi Stacks at Peripheral Endoplasmic Reticulum Exit Sites." *Molecular Biology of the Cell* 7 (4): 631–50.

Connolly, J. A., V. I. Kalnins, D. W. Cleveland, and M. W. Kirschner. 1977. "Immunofluorescent Staining of Cytoplasmic and Spindle Microtubules in Mouse Fibroblasts with Antibody to Tau Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (6): 2437–40.

Cooper, A. A. 2006. "-Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron

Loss in Parkinson's Models." *Science* 313 (5785): 324–28. doi:10.1126/science.1129462.

Corda, Daniela, Maria Luisa Barretta, Romina Ines Cervigni, and Antonino Colanzi. 2012. "Golgi Complex Fragmentation in G2/M Transition: An Organelle-Based Cell-Cycle Checkpoint." *IUBMB Life* 64 (8): 661–70. doi:10.1002/iub.1054.

Coune, P. G., J. C. Bensadoun, P. Aebischer, and B. L. Schneider. 2011. "Rab1A over-Expression Prevents Golgi Apparatus Fragmentation and Partially Corrects Motor Deficits in an Alpha-Synuclein Based Rat Model of Parkinson's Disease." *Journal of Parkinson's Disease* 1 (4): 373–87. doi:10.3233/JPD-2011-11058.

Cowan, Catherine M., Francis Chee, David Shepherd, and Amritpal Mudher. 2010. "Disruption of Neuronal Function by Soluble Hyperphosphorylated Tau in a Drosophila Model of Tauopathy." *Biochemical Society Transactions* 38 (2): 564–70. doi:10.1042/BST0380564.

Dalton, A. J., and M. D. Felix. 1954. "Cytologic and Cytochemical Characteristics of the Golgi Substance of Epithelial Cells of the Epididymis in Situ, in Homogenates and after Isolation." *The American Journal of Anatomy* 94 (2): 171–207. doi:10.1002/aja.1000940202.

———. 1956. "A Comparative Study of the Golgi Complex." *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2 (4 Suppl): 79–84.

De Matteis, M. A., and J. S. Morrow. 1998. "The Role of Ankyrin and Spectrin in Membrane Transport and Domain Formation." *Current Opinion in Cell Biology* 10 (4): 542–49.

———. 2000. "Spectrin Tethers and Mesh in the Biosynthetic Pathway." *Journal of Cell Science* 113 (Pt 13) (July): 2331–43.

Del Sole, A., S. Malaspina, and Alberto Magenta Biasina. 2016. "Magnetic Resonance Imaging and Positron Emission Tomography in the Diagnosis of Neurodegenerative Dementias." *Functional Neurology*, October, 1–11.

Diao, Aipo, Dinah Rahman, Darryl J.C. Pappin, John Lucocq, and Martin Lowe. 2003. "The Coiled-Coil Membrane Protein Golgin-84 Is a Novel Rab Effector Required for Golgi Ribbon Formation." *The Journal of Cell Biology* 160 (2): 201–12. doi:10.1083/jcb.200207045.

DiTella, M. C., F. Feiguin, N. Carri, K. S. Kosik, and A. Cáceres. 1996. "MAP-1B/TAU Functional Redundancy during Laminin-Enhanced Axonal Growth." *Journal of Cell Science* 109 (Pt 2) (February): 467–77.

Dowood, Rua Kareem, Ravi Adusumalli, Emil Tykesson, Elin Johnsen, Elsa Lundanes, Kristian Prydz, and Steven Ray Wilson. 2016. "Determination of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate in Cells and Golgi Fractions Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography. A* 1470 (October): 70–75. doi:10.1016/j.chroma.2016.10.001.

Drechsel, D. N., A. A. Hyman, M. H. Cobb, and M. W. Kirschner. 1992. "Modulation of the Dynamic Instability of Tubulin Assembly by the Microtubule-Associated Protein Tau." *Molecular Biology of the Cell* 3 (10): 1141–54.

Dries, Daniel R., and Gang Yu. 2008. "Assembly, Maturation, and Trafficking of the Gamma-Secretase Complex in Alzheimer's Disease." *Current Alzheimer Research* 5 (2): 132–46.

Duran, Juan M., Christophe Anjard, Chris Stefan, William F. Loomis, and Vivek Malhotra. 2010. "Unconventional Secretion of Acb1 Is Mediated by Autophagosomes." *The Journal of Cell Biology* 188 (4): 527–36. doi:10.1083/jcb.200911154.

Duyckaerts, C., M. Bennechib, Y. Grignon, T. Uchihara, Y. He, F. Piette, and J. J. Hauw. 1997. "Modeling the Relation between Neurofibrillary Tangles and Intellectual Status." *Neurobiology of Aging* 18 (3): 267–73.

Ebneth, A., G. Drewes, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1999. "Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK Kinases Leads to the Destabilization of Microtubules in Cells." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 44 (3): 209–24. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(199911)44:3<209::AID-CM6>3.0.CO;2-4.

Fan, Jie, Zhiping Hu, Liuwang Zeng, Wei Lu, Xiangqi Tang, Jie Zhang, and Ting Li. 2008. "Golgi Apparatus and Neurodegenerative Diseases." *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26 (6): 523–34. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.05.006.

Farah, Carole Abi, Sébastien Perreault, Dalinda Liazoghli, Mylène Desjardins, Angela Anton, Michel Lauzon, Jacques Paiement, and Nicole Leclerc. 2006. "Tau Interacts with Golgi Membranes and Mediates Their Association with Microtubules." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63 (11): 710–24. doi:10.1002/cm.20157.

Farhan, Hesso, and Catherine Rabouille. 2011. "Signalling to and from the Secretory Pathway." *Journal of Cell Science* 124 (Pt 2): 171–80. doi:10.1242/jcs.076455.

Farquhar, M. G., and G. E. Palade. 1981. "The Golgi Apparatus (Complex)-(1954-1981)-from Artifact to Center Stage." *The Journal of Cell Biology* 91 (3 Pt 2): 77s–103s.

Farquhar, M. G., and J. F. Rinehart. 1954. "Cytologic Alterations in the Anterior Pituitary Gland Following Thyroidectomy: An Electron Microscope Study." *Endocrinology* 65 (6): 857–76.

Fatal, Netta, Taina Suntio, and Marja Makarow. 2002. "Selective Protein Exit from Yeast Endoplasmic Reticulum in Absence of Functional COPII Coat Component Sec13p." *Molecular Biology of the Cell* 13 (12): 4130–40. doi:10.1091/mbc.02-05-0082.

Feinstein, Stuart C., and Leslie Wilson. 2005. "Inability of Tau to Properly Regulate Neuronal Microtubule Dynamics: A Loss-of-Function Mechanism by Which Tau Might Mediate Neuronal Cell Death." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1739 (2–3): 268–79. doi:10.1016/j.bbadis.2004.07.002.

Feinstein, T. N., and A. D. Linstedt. 2008. "GRASP55 Regulates Golgi Ribbon Formation." *Molecular Biology of the Cell* 19 (7): 2696–2707. doi:10.1091/mbc.E07-11-1200.

Fishman, J. B., and R. E. Fine. 1987. "A Trans Golgi-Derived Exocytic Coated Vesicle Can Contain Both Newly Synthesized Cholinesterase and Internalized Transferrin." *Cell* 48 (1): 157–64.

Fivaz, Marc, Francis Vilbois, Sarah Thurnheer, Christian Pasquali, Laurence Abrami, Perry E. Bickel, Robert G. Parton, and F. Gisou van der Goot. 2002. "Differential Sorting and Fate of Endocytosed GPI-Anchored Proteins." *The EMBO Journal* 21 (15): 3989–4000. doi:10.1093/emboj/cdf398.

Fujita, Yukio, Koichi Okamoto, Atsushi Sakurai, Hirofumi Kusaka, Hitoshi Aizawa, Ban Mihara, and Nicholas K. Gonatas. 2002. "The Golgi Apparatus Is Fragmented in Spinal Cord Motor Neurons of Amyotrophic Lateral Sclerosis with Basophilic Inclusions." *Acta Neuropathologica* 103 (3): 243–47. doi:10.1007/s004010100461.

Giuditta, Antonio, Jong Tai Chun, Maria Eyman, Carolina Cefaliello, Anna Paola Bruno, and Marianna Crispino. 2008. "Local Gene Expression in Axons and Nerve Endings: The Glia-Neuron Unit." *Physiological Reviews* 88 (2): 515–55. doi:10.1152/physrev.00051.2006.

Glenner, G. G., and C. W. Wong. 1984. "Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein." *Biochemical*

and *Biophysical Research Communications* 120 (3): 885–90.

Glick, B. S. 2000. “Organization of the Golgi Apparatus.” *Current Opinion in Cell Biology* 12 (4): 450–56.

Glick, Benjamin S., and Akihiko Nakano. 2009. “Membrane Traffic within the Golgi Apparatus.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 113–32. doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175421.

Goedert, M., and R. Jakes. 1990. “Expression of Separate Isoforms of Human Tau Protein: Correlation with the Tau Pattern in Brain and Effects on Tubulin Polymerization.” *The EMBO Journal* 9 (13): 4225–30.

Goedert, M., M. G. Spillantini, N. J. Cairns, and R. A. Crowther. 1992. “Tau Proteins of Alzheimer Paired Helical Filaments: Abnormal Phosphorylation of All Six Brain Isoforms.” *Neuron* 8 (1): 159–68.

Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, and R. A. Crowther. 1989. “Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer’s Disease.” *Neuron* 3 (4): 519–26.

Goedert, M., M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich, and R. A. Crowther. 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.” *The EMBO Journal* 8 (2): 393–99.

Goedert, Michel. 2004. “Tau Protein and Neurodegeneration.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15 (1): 45–49. doi:10.1016/j.semcdb.2003.12.015.

Golgi, C. 1899a. “On the Structure of Nerve Cells. 1898.” *Journal of Microscopy* 155 (Pt 1): 3–7.

———. 1899b. “On the Structure of the Nerve Cells of the Spinal Ganglia. 1898.” *Journal of Microscopy* 155 (Pt 1): 9–14.

Golgi, C., M. Bentivoglio, and L. Swanson. 2001. “On the Fine Structure of the Pes Hippocampi Major (with Plates XIII-XXIII). 1886.” *Brain Research Bulletin* 54 (5): 461–83.

Gonatas, N. K., A. Stieber, Z. Mourelatos, Y. Chen, J. O. Gonatas, S. H. Appel, A. P. Hays, W. F. Hickey, and J. J. Hauw. 1992. “Fragmentation of the Golgi Apparatus of Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis.” *The American Journal of Pathology* 140 (3): 731–37.

Gong, C. X., T. J. Singh, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1993. "Phosphoprotein Phosphatase Activities in Alzheimer Disease Brain." *Journal of Neurochemistry* 61 (3): 921–27.

Goode, B. L., P. E. Denis, D. Panda, M. J. Radeke, H. P. Miller, L. Wilson, and S. C. Feinstein. 1997. "Functional Interactions between the Proline-Rich and Repeat Regions of Tau Enhance Microtubule Binding and Assembly." *Molecular Biology of the Cell* 8 (2): 353–65.

Goode, B. L., and S. C. Feinstein. 1994. "Identification of a Novel Microtubule Binding and Assembly Domain in the Developmentally Regulated Inter-Repeat Region of Tau." *The Journal of Cell Biology* 124 (5): 769–82.

Götz, J., F. Chen, J. van Dorpe, and R. M. Nitsch. 2001. "Formation of Neurofibrillary Tangles in P3011 Tau Transgenic Mice Induced by Abeta 42 Fibrils." *Science (New York, N.Y.)* 293 (5534): 1491–95. doi:10.1126/science.1062097.

Gousset, Karine, Edwin Schiff, Christelle Langevin, Zrinka Marijanovic, Anna Caputo, Duncan T. Browman, Nicolas Chenouard, et al. 2009. "Prions Hijack Tunneling Nanotubes for Intercellular Spread." *Nature Cell Biology* 11 (3): 328–36. doi:10.1038/ncb1841.

Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, and L. I. Binder. 1986. "Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau (Tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13): 4913–17.

Gu, Y., F. Oyama, and Y. Ihara. 1996. "Tau Is Widely Expressed in Rat Tissues." *Journal of Neurochemistry* 67 (3): 1235–44.

Gundersen, G. G., M. H. Kalnoski, and J. C. Bulinski. 1984. "Distinct Populations of Microtubules: Tyrosinated and Nontyrosinated Alpha Tubulin Are Distributed Differently in Vivo." *Cell* 38 (3): 779–89.

Haase, C., J. T. Stieler, T. Arendt, and M. Holzer. 2004. "Pseudophosphorylation of Tau Protein Alters Its Ability for Self-Aggregation." *Journal of Neurochemistry* 88 (6): 1509–20.

Haase, Georg, and Catherine Rabouille. 2015. "Golgi Fragmentation in ALS Motor Neurons. New Mechanisms Targeting Microtubules, Tethers, and Transport Vesicles." *Frontiers in Neuroscience* 9: 448. doi:10.3389/fnins.2015.00448.

Hamano, Tadanori, Tania F. Gendron, Ena Causevic, Shu-Hui Yen, Wen-Lang Lin,

Ciro Isidoro, Michael Deture, and Li-wen Ko. 2008. "Autophagic-Lysosomal Perturbation Enhances Tau Aggregation in Transfectants with Induced Wild-Type Tau Expression." *The European Journal of Neuroscience* 27 (5): 1119–30. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06084.x.

Hanger, Diane, Lau Dawn H.W, Phillips Emma C, Bondulich Marie K, Guo Tong, Woodward Benjamin W, Pooler Amy M, and Noble Wendy. 2014. "Intracellular and Extracellular Roles for Tau in Neurodegenerative Disease." *Journal of Alzheimer's Disease*, no. s1: S37–S45. doi:10.3233/JAD-132054.

Hanger, Diane P., Brian H. Anderton, and Wendy Noble. 2009. "Tau Phosphorylation: The Therapeutic Challenge for Neurodegenerative Disease." *Trends in Molecular Medicine* 15 (3): 112–19. doi:10.1016/j.molmed.2009.01.003.

Harada, A., K. Oguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda, and N. Hirokawa. 1994. "Altered Microtubule Organization in Small-Calibre Axons of Mice Lacking Tau Protein." *Nature* 369 (6480): 488–91. doi:10.1038/369488a0.

Hardy, John, and Dennis J. Selkoe. 2002. "The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics." *Science (New York, N.Y.)* 297 (5580): 353–56. doi:10.1126/science.1072994.

Henríquez, J. P., D. Cross, C. Vial, and R. B. Maccioni. 1995. "Subpopulations of Tau Interact with Microtubules and Actin Filaments in Various Cell Types." *Cell Biochemistry and Function* 13 (4): 239–50. doi:10.1002/cbf.290130404.

Himmler, A., D. Drechsel, M. W. Kirschner, and D. W. Martin. 1989. "Tau Consists of a Set of Proteins with Repeated C-Terminal Microtubule-Binding Domains and Variable N-Terminal Domains." *Molecular and Cellular Biology* 9 (4): 1381–88.

Hirokawa, N. 1990. "[Neuronal cytoskeleton: molecular architecture, function and dynamics]." *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme* 35 (4 Suppl): 480–507.

Hirokawa, N., Y. Shiomura, and S. Okabe. 1988. "Tau Proteins: The Molecular Structure and Mode of Binding on Microtubules." *The Journal of Cell Biology* 107 (4): 1449–59.

Ho, W. C., V. J. Allan, G. van Meer, E. G. Berger, and T. E. Kreis. 1989. "Reclustering of Scattered Golgi Elements Occurs along Microtubules." *European Journal of*

Cell Biology 48 (2): 250–63.

Hoehn, Katja, and Elaine Marieb. 2010. *Human Anatomy Andphysiology*. 8th ed., Pearson int. ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

Hong, M., V. Zhukareva, V. Vogelsberg-Ragaglia, Z. Wszolek, L. Reed, B. I. Miller, D. H. Geschwind, et al. 1998. “Mutation-Specific Functional Impairments in Distinct Tau Isoforms of Hereditary FTDP-17.” *Science (New York, N.Y.)* 282 (5395): 1914–17.

Horowitz, Peleg M., Kristina R. Patterson, Angela L. Guillozet-Bongaarts, Matthew R. Reynolds, Christopher A. Carroll, Susan T. Weintraub, David A. Bennett, Vincent L. Cryns, Robert W. Berry, and Lester I. Binder. 2004. “Early N-Terminal Changes and Caspase-6 Cleavage of Tau in Alzheimer’s Disease.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (36): 7895–7902. doi:10.1523/JNEUROSCI.1988-04.2004.

Hsu, Jia-Wei, Pei-Hua Tang, I.-Hao Wang, Chia-Lun Liu, Wen-Hui Chen, Pei-Chin Tsai, Kuan-Yu Chen, Kuan-Jung Chen, Chia-Jung Yu, and Fang-Jen S. Lee. 2016. “Unfolded Protein Response Regulates Yeast Small GTPase Arl1p Activation at Late Golgi via Phosphorylation of Arf GEF Syt1p.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (12): E1683-1690. doi:10.1073/pnas.1518260113.

Hutton, M., C. L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, et al. 1998. “Association of Missense and 5’-splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17.” *Nature* 393 (6686): 702–5. doi:10.1038/31508.

Hwang, S. C., D. Y. Jhon, Y. S. Bae, J. H. Kim, and S. G. Rhee. 1996. “Activation of Phospholipase C-Gamma by the Concerted Action of Tau Proteins and Arachidonic Acid.” *The Journal of Biological Chemistry* 271 (31): 18342–49.

Iba, Michiyo, Jing L. Guo, Jennifer D. McBride, Bin Zhang, John Q. Trojanowski, and Virginia M.-Y. Lee. 2013. “Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s-like Tauopathy.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (3): 1024–37. doi:10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013.

Ikegami, S., A. Harada, and N. Hirokawa. 2000. “Muscle Weakness, Hyperactivity, and Impairment in Fear Conditioning in Tau-Deficient Mice.” *Neuroscience Letters* 279 (3): 129–32.

Imahori, K., and T. Uchida. 1997. “Physiology and Pathology of Tau Protein Kinases

in Relation to Alzheimer's Disease." *Journal of Biochemistry* 121 (2): 179–88.

Iqbal, Khalid, Alejandra del C. Alonso, Ezzat El-Akkad, Cheng-Xin Gong, Niloufar Haque, Sabiha Khatoon, Jin-Jing Pei, Ichiro Tsujio, Jian-Zhi Wang, and Inge Grundke-Iqbal. 2002. "Significance and Mechanism of Alzheimer Neurofibrillary Degeneration and Therapeutic Targets to Inhibit This Lesion." *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 19 (1–2): 95–99.

Ishiguro, K., A. Shiratsuchi, S. Sato, A. Omori, M. Arioka, S. Kobayashi, T. Uchida, and K. Imahori. 1993. "Glycogen Synthase Kinase 3 Beta Is Identical to Tau Protein Kinase I Generating Several Epitopes of Paired Helical Filaments." *FEBS Letters* 325 (3): 167–72.

Ishiguro, K., M. Takamatsu, K. Tomizawa, A. Omori, M. Takahashi, M. Arioka, T. Uchida, and K. Imahori. 1992. "Tau Protein Kinase I Converts Normal Tau Protein into A68-like Component of Paired Helical Filaments." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (15): 10897–901.

Itin, C., C. Rancaño, Y. Nakajima, and S. R. Pfeffer. 1997. "A Novel Assay Reveals a Role for Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion Attachment Protein in Mannose 6-Phosphate Receptor Transport from Endosomes to the Trans Golgi Network." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (44): 27737–44.

Ittner, Lars M., Yazid D. Ke, Fabien Delerue, Mian Bi, Amadeus Gladbach, Janet van Eersel, Heidrun Wölfing, et al. 2010. "Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid-Beta Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models." *Cell* 142 (3): 387–97. doi:10.1016/j.cell.2010.06.036.

Jackson, George R., Martina Wiedau-Pazos, Tzu-Kang Sang, Naveed Wagle, Carlos A. Brown, Sasan Massachi, and Daniel H. Geschwind. 2002. "Human Wild-Type Tau Interacts with Wingless Pathway Components and Produces Neurofibrillary Pathology in *Drosophila*." *Neuron* 34 (4): 509–19.

Jasmin, B. J., J. P. Changeux, and J. Cartaud. 1990. "Compartmentalization of Cold-Stable and Acetylated Microtubules in the Subsynaptic Domain of Chick Skeletal Muscle Fibre." *Nature* 344 (6267): 673–75. doi:10.1038/344673a0.

Jeganathan, Sadasivam, Antje Hascher, Subashchandrabose Chinnathambi, Jacek Biernat, Eva-Maria Mandelkow, and Eckhard Mandelkow. 2008. "Proline-Directed Pseudo-Phosphorylation at AT8 and PHF1 Epitopes Induces a Compaction of the Paperclip Folding of

Tau and Generates a Pathological (MC-1) Conformation.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (46): 32066–76. doi:10.1074/jbc.M805300200.

Jenkins, S. M., and G. V. Johnson. 1998. “Tau Complexes with Phospholipase C-Gamma in Situ.” *Neuroreport* 9 (1): 67–71.

Jiang, Qian, Lu Wang, Yang Guan, Hui Xu, Yi Niu, Li Han, Yu-Ping Wei, et al. 2014. “Golgin-84-Associated Golgi Fragmentation Triggers Tau Hyperphosphorylation by Activation of Cyclin-Dependent Kinase-5 and Extracellular Signal-Regulated Kinase.” *Neurobiology of Aging* 35 (6): 1352–63. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.022.

Jin, M., and M. D. Snider. 1993. “Role of Microtubules in Transferrin Receptor Transport from the Cell Surface to Endosomes and the Golgi Complex.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (24): 18390–97.

Johnson, G. V. 1992. “Differential Phosphorylation of Tau by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II: Metabolic and Functional Consequences.” *Journal of Neurochemistry* 59 (6): 2056–62.

Joshi, Gunjan, Michael E. Bekier, and Yanzhuang Wang. 2015. “Golgi Fragmentation in Alzheimer’s Disease.” *Frontiers in Neuroscience* 9: 340. doi:10.3389/fnins.2015.00340.

Joshi, Gunjan, Youjian Chi, Zheping Huang, and Yanzhuang Wang. 2014. “A β -Induced Golgi Fragmentation in Alzheimer’s Disease Enhances A β Production.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (13): E1230-1239. doi:10.1073/pnas.1320192111.

Joshi, Gunjan, and Yanzhuang Wang. 2015. “Golgi Defects Enhance APP Amyloidogenic Processing in Alzheimer’s Disease.” *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 37 (3): 240–47. doi:10.1002/bies.201400116.

Jucker, Mathias, and Lary C. Walker. 2013. “Self-Propagation of Pathogenic Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases.” *Nature* 501 (7465): 45–51. doi:10.1038/nature12481.

Kanai, Y., J. Chen, and N. Hirokawa. 1992. “Microtubule Bundling by Tau Proteins in Vivo: Analysis of Functional Domains.” *The EMBO Journal* 11 (11): 3953–61.

Kanai, Y., R. Takemura, T. Oshima, H. Mori, Y. Ihara, M. Yanagisawa, T. Masaki, and N. Hirokawa. 1989. “Expression of Multiple Tau Isoforms and Microtubule Bundle Formation in Fibroblasts Transfected with a Single Tau cDNA.” *The Journal of Cell Biology*

109 (3): 1173–84.

Kandel, Eric R., ed. 2013. *Principles of Neural Science*. 5th ed. New York: McGraw-Hill.

Kar, Santwana, Juan Fan, Michael J. Smith, Michel Goedert, and Linda A. Amos. 2003. “Repeat Motifs of Tau Bind to the Insides of Microtubules in the Absence of Taxol.” *The EMBO Journal* 22 (1): 70–77. doi:10.1093/emboj/cdg001.

Kayed, Rakez, and Cristian A. Lasagna-Reeves. 2013. “Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 33 Suppl 1: S67-78. doi:10.3233/JAD-2012-129001.

Kempf, M., A. Clement, A. Faissner, G. Lee, and R. Brandt. 1996. “Tau Binds to the Distal Axon Early in Development of Polarity in a Microtubule- and Microfilament-Dependent Manner.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (18): 5583–92.

Kfoury, Najla, Brandon B. Holmes, Hong Jiang, David M. Holtzman, and Marc I. Diamond. 2012. “Trans-Cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (23): 19440–51. doi:10.1074/jbc.M112.346072.

Kidd, M. 1963. “Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer’s Disease.” *Nature* 197 (January): 192–93.

Kirkbride, Kellye C., Nan Hyung Hong, Christi L. French, Emily S. Clark, W. Gray Jerome, and Alissa M. Weaver. 2012. “Regulation of Late Endosomal/Lysosomal Maturation and Trafficking by Cortactin Affects Golgi Morphology.” *Cytoskeleton* 69 (9): 625–43. doi:10.1002/cm.21051.

Kitazume, Shinobu, Ritsuko Oka, Kazuko Ogawa, Satoshi Futakawa, Yoshiaki Hagiwara, Hajime Takikawa, Michio Kato, et al. 2009. “Molecular Insights into Beta-Galactoside alpha2,6-Sialyltransferase Secretion in Vivo.” *Glycobiology* 19 (5): 479–87. doi:10.1093/glycob/cwp003.

Klumperman, J. 2011. “Architecture of the Mammalian Golgi.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (7): a005181–a005181. doi:10.1101/cshperspect.a005181.

Knops, J., K. S. Kosik, G. Lee, J. D. Pardee, L. Cohen-Gould, and L. McConlogue. 1991. “Overexpression of Tau in a Nonneuronal Cell Induces Long Cellular Processes.” *The Journal of Cell Biology* 114 (4): 725–33.

Kondoh, Kunio, Satoru Torii, and Eisuke Nishida. 2005. "Control of MAP Kinase Signaling to the Nucleus." *Chromosoma* 114 (2): 86–91. doi:10.1007/s00412-005-0341-9.

Köpke, E., Y. C. Tung, S. Shaikh, A. C. Alonso, K. Iqbal, and I. Grundke-Iqbal. 1993. "Microtubule-Associated Protein Tau. Abnormal Phosphorylation of a Non-Paired Helical Filament Pool in Alzheimer Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (32): 24374–84.

Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1976. "Comparative Aspects of Glycoprotein Structure." *Annual Review of Biochemistry* 45: 217–37. doi:10.1146/annurev.bi.45.070176.001245.

———. 1985. "Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides." *Annual Review of Biochemistry* 54: 631–64. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.003215.

Kornfeld, S. 1992. "Structure and Function of the Mannose 6-Phosphate/Insulinlike Growth Factor II Receptors." *Annual Review of Biochemistry* 61: 307–30. doi:10.1146/annurev.bi.61.070192.001515.

Kosik, K. S., L. D. Orecchio, S. Bakalis, and R. L. Neve. 1989. "Developmentally Regulated Expression of Specific Tau Sequences." *Neuron* 2 (4): 1389–97.

Kreis, T. E. 1987. "Microtubules Containing Detyrosinated Tubulin Are Less Dynamic." *The EMBO Journal* 6 (9): 2597–2606.

Ksiezak-Reding, H., W. K. Liu, and S. H. Yen. 1992. "Phosphate Analysis and Dephosphorylation of Modified Tau Associated with Paired Helical Filaments." *Brain Research* 597 (2): 209–19.

Ladinsky, M. S., D. N. Mastrorade, J. R. McIntosh, K. E. Howell, and L. A. Staehelin. 1999. "Golgi Structure in Three Dimensions: Functional Insights from the Normal Rat Kidney Cell." *The Journal of Cell Biology* 144 (6): 1135–49.

Lakkaraju, Aparna, and Enrique Rodriguez-Boulan. 2008. "Itinerant Exosomes: Emerging Roles in Cell and Tissue Polarity." *Trends in Cell Biology* 18 (5): 199–209. doi:10.1016/j.tcb.2008.03.002.

Lasagna-Reeves, Cristian A., Diana L. Castillo-Carranza, Urmi Sengupta, Marcos J. Guerrero-Munoz, Takaki Kiritoshi, Volker Neugebauer, George R. Jackson, and Rakez Kaye. 2012. "Alzheimer Brain-Derived Tau Oligomers Propagate Pathology from Endogenous Tau." *Scientific Reports* 2: 700. doi:10.1038/srep00700.

Le Borgne, R., and B. Hoflack. 1998. "Protein Transport from the Secretory to the Endocytic Pathway in Mammalian Cells." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1404 (1–2): 195–209.

Leclerc, N., P. W. Baas, C. C. Garner, and K. S. Kosik. 1996. "Juvenile and Mature MAP2 Isoforms Induce Distinct Patterns of Process Outgrowth." *Molecular Biology of the Cell* 7 (3): 443–55.

Lee, G., R. L. Neve, and K. S. Kosik. 1989. "The Microtubule Binding Domain of Tau Protein." *Neuron* 2 (6): 1615–24.

Lee, G., S. T. Newman, D. L. Gard, H. Band, and G. Panchamoorthy. 1998. "Tau Interacts with Src-Family Non-Receptor Tyrosine Kinases." *Journal of Cell Science* 111 (Pt 21) (November): 3167–77.

Lee, S., Y. Sato, and R. A. Nixon. 2011. "Lysosomal Proteolysis Inhibition Selectively Disrupts Axonal Transport of Degradative Organelles and Causes an Alzheimer's-Like Axonal Dystrophy." *Journal of Neuroscience* 31 (21): 7817–30. doi:10.1523/JNEUROSCI.6412-10.2011.

Lee, Sooyeon, Yutaka Sato, and Ralph A. Nixon. 2011. "Primary Lysosomal Dysfunction Causes Cargo-Specific Deficits of Axonal Transport Leading to Alzheimer-like Neuritic Dystrophy." *Autophagy* 7 (12): 1562–63.

Lee, T. H., and A. D. Linstedt. 1999. "Osmotically Induced Cell Volume Changes Alter Anterograde and Retrograde Transport, Golgi Structure, and COPI Dissociation." *Molecular Biology of the Cell* 10 (5): 1445–62.

Lee, V. M., M. Goedert, and J. Q. Trojanowski. 2001. "Neurodegenerative Tauopathies." *Annual Review of Neuroscience* 24: 1121–59. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1121.

Leugers, Chad J., and Gloria Lee. 2010. "Tau Potentiates Nerve Growth Factor-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Neurite Initiation without a Requirement for Microtubule Binding." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (25): 19125–34. doi:10.1074/jbc.M110.105387.

Lewin, Benjamin, and Chrystelle Sanlaville. 1999. *Gènes VI*. Paris; Bruxelles: De Boeck Université.

Li, Tong, and Hemant K. Paudel. 2006. "Glycogen Synthase Kinase 3beta

Phosphorylates Alzheimer's Disease-Specific Ser396 of Microtubule-Associated Protein Tau by a Sequential Mechanism.” *Biochemistry* 45 (10): 3125–33. doi:10.1021/bi051634r.

Liazoghli, Dalinda, Sebastien Perreault, Kristina D. Micheva, Mylène Desjardins, and Nicole Leclerc. 2005. “Fragmentation of the Golgi Apparatus Induced by the Overexpression of Wild-Type and Mutant Human Tau Forms in Neurons.” *The American Journal of Pathology* 166 (5): 1499–1514. doi:10.1016/S0002-9440(10)62366-8.

Lin, Wen-Lang, Jada Lewis, Shu-Hui Yen, Michael Hutton, and Dennis W. Dickson. 2003. “Ultrastructural Neuronal Pathology in Transgenic Mice Expressing Mutant (P301L) Human Tau.” *Journal of Neurocytology* 32 (9): 1091–1105. doi:10.1023/B:NEUR.0000021904.61387.95.

Lindwall, G., and R. D. Cole. 1984. “Phosphorylation Affects the Ability of Tau Protein to Promote Microtubule Assembly.” *The Journal of Biological Chemistry* 259 (8): 5301–5.

Lippa, C. F., J. E. Hamos, T. W. Smith, D. Pulaski-Salo, and D. A. Drachman. 1993. “Vascular Amyloid Deposition in Alzheimer's Disease. Neither Necessary nor Sufficient for the Local Formation of Plaques or Tangles.” *Archives of Neurology* 50 (10): 1088–92.

Litersky, J. M., and G. V. Johnson. 1992. “Phosphorylation by cAMP-Dependent Protein Kinase Inhibits the Degradation of Tau by Calpain.” *The Journal of Biological Chemistry* 267 (3): 1563–68.

———. 1995. “Phosphorylation of Tau in Situ: Inhibition of Calcium-Dependent Proteolysis.” *Journal of Neurochemistry* 65 (2): 903–11.

Litman, P., J. Barg, and I. Ginzburg. 1994. “Microtubules Are Involved in the Localization of Tau mRNA in Primary Neuronal Cell Cultures.” *Neuron* 13 (6): 1463–74.

Litman, P., J. Barg, L. Rindzoonski, and I. Ginzburg. 1993. “Subcellular Localization of Tau mRNA in Differentiating Neuronal Cell Culture: Implications for Neuronal Polarity.” *Neuron* 10 (4): 627–38.

Liu, Chia-Chen, Chih-Wei Tsai, Ferenc Deak, Justin Rogers, Michael Penuliar, You Me Sung, James N. Maher, et al. 2014. “Deficiency in LRP6-Mediated Wnt Signaling Contributes to Synaptic Abnormalities and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease.” *Neuron* 84 (1): 63–77. doi:10.1016/j.neuron.2014.08.048.

Liu, Fei, and Cheng-Xin Gong. 2008. “Tau Exon 10 Alternative Splicing and

Tauopathies.” *Molecular Neurodegeneration* 3 (1): 8. doi:10.1186/1750-1326-3-8.

Liu, Fei, Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, and Cheng-Xin Gong. 2005. “Contributions of Protein Phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the Regulation of Tau Phosphorylation.” *The European Journal of Neuroscience* 22 (8): 1942–50. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x.

Liu, Fei, Khalid Iqbal, Inge Grundke-Iqbal, Gerald W. Hart, and Cheng-Xin Gong. 2004. “O-GlcNAcylation Regulates Phosphorylation of Tau: A Mechanism Involved in Alzheimer’s Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (29): 10804–9. doi:10.1073/pnas.0400348101.

Lombardi, D., T. Soldati, M. A. Riederer, Y. Goda, M. Zerial, and S. R. Pfeffer. 1993. “Rab9 Functions in Transport between Late Endosomes and the Trans Golgi Network.” *The EMBO Journal* 12 (2): 677–82.

Lowe, M., N. K. Gonatas, and G. Warren. 2000. “The Mitotic Phosphorylation Cycle of the Cis-Golgi Matrix Protein GM130.” *The Journal of Cell Biology* 149 (2): 341–56.

Lowe, M., C. Rabouille, N. Nakamura, R. Watson, M. Jackman, E. Jämsä, D. Rahman, D. J. Pappin, and G. Warren. 1998. “Cdc2 Kinase Directly Phosphorylates the Cis-Golgi Matrix Protein GM130 and Is Required for Golgi Fragmentation in Mitosis.” *Cell* 94 (6): 783–93.

Lucocq, J. M., and G. Warren. 1987. “Fragmentation and Partitioning of the Golgi Apparatus during Mitosis in HeLa Cells.” *The EMBO Journal* 6 (11): 3239–46.

Lupashin, Vladimir, and Daniel Ungar. 2008. “COG Complex.” In *The Golgi Apparatus*, edited by Alexander A. Mironov and Margit Pavelka, 120–29. Vienna: Springer Vienna. http://link.springer.com/10.1007/978-3-211-76310-0_9.

MacRae, T. H. 1997. “Tubulin Post-Translational Modifications--Enzymes and Their Mechanisms of Action.” *European Journal of Biochemistry* 244 (2): 265–78.

Mallard, F., C. Antony, D. Tenza, J. Salamero, B. Goud, and L. Johannes. 1998. “Direct Pathway from Early/Recycling Endosomes to the Golgi Apparatus Revealed through the Study of Shiga Toxin B-Fragment Transport.” *The Journal of Cell Biology* 143 (4): 973–90.

Mallard, Frédéric, Bor Luen Tang, Thierry Galli, Danièle Tenza, Agnès Saint-Pol, Xu Yue, Claude Antony, Wanjin Hong, Bruno Goud, and Ludger Johannes. 2002.

“Early/Recycling Endosomes-to-TGN Transport Involves Two SNARE Complexes and a Rab6 Isoform.” *The Journal of Cell Biology* 156 (4): 653–64. doi:10.1083/jcb.200110081.

Mandelkow, E.-M., K. Stamer, R. Vogel, E. Thies, and E. Mandelkow. 2003. “Clogging of Axons by Tau, Inhibition of Axonal Traffic and Starvation of Synapses.” *Neurobiology of Aging* 24 (8): 1079–85.

Mansuroglu, Zeyni, Houda Benhelli-Mokrani, Vasco Marcato, Audrey Sultan, Marie Violet, Alban Chauderlier, Lucie Delattre, et al. 2016. “Loss of Tau Protein Affects the Structure, Transcription and Repair of Neuronal Pericentromeric Heterochromatin.” *Scientific Reports* 6 (September): 33047. doi:10.1038/srep33047.

Marcello, Elena, Roberta Epis, Claudia Saraceno, and Monica Di Luca. 2012. “Synaptic Dysfunction in Alzheimer’s Disease.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 970: 573–601. doi:10.1007/978-3-7091-0932-8_25.

Marsh, B. J., D. N. Mastronarde, K. F. Buttle, K. E. Howell, and J. R. McIntosh. 2001. “Organellar Relationships in the Golgi Region of the Pancreatic Beta Cell Line, HIT-T15, Visualized by High Resolution Electron Tomography.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (5): 2399–2406. doi:10.1073/pnas.051631998.

Martin, Ludovic, Xenia Latypova, and Faraj Terro. 2011. “Post-Translational Modifications of Tau Protein: Implications for Alzheimer’s Disease.” *Neurochemistry International* 58 (4): 458–71. doi:10.1016/j.neuint.2010.12.023.

Martin, Ludovic, Xenia Latypova, Cornelia M. Wilson, Amandine Magnaudeix, Marie-Laure Perrin, and Faraj Terro. 2013. “Tau Protein Phosphatases in Alzheimer’s Disease: The Leading Role of PP2A.” *Ageing Research Reviews* 12 (1): 39–49. doi:10.1016/j.arr.2012.06.008.

Martin, Ludovic, Xenia Latypova, Cornelia M. Wilson, Amandine Magnaudeix, Marie-Laure Perrin, Catherine Yardin, and Faraj Terro. 2013. “Tau Protein Kinases: Involvement in Alzheimer’s Disease.” *Ageing Research Reviews* 12 (1): 289–309. doi:10.1016/j.arr.2012.06.003.

Martínez-Menárguez, J. A., H. J. Geuze, J. W. Slot, and J. Klumperman. 1999. “Vesicular Tubular Clusters between the ER and Golgi Mediate Concentration of Soluble Secretory Proteins by Exclusion from COPI-Coated Vesicles.” *Cell* 98 (1): 81–90. doi:10.1016/S0092-8674(00)80608-X.

Maurer, K., S. Volk, and H. Gerbaldo. 1997. "Auguste D and Alzheimer's Disease." *Lancet (London, England)* 349 (9064): 1546–49. doi:10.1016/S0140-6736(96)10203-8.

Merlini, Mario, Debora Wanner, and Roger M. Nitsch. 2016. "Tau Pathology-Dependent Remodelling of Cerebral Arteries Precedes Alzheimer's Disease-Related Microvascular Cerebral Amyloid Angiopathy." *Acta Neuropathologica* 131 (5): 737–52. doi:10.1007/s00401-016-1560-2.

Mi, Kaihong, and Gail V. W. Johnson. 2006. "The Role of Tau Phosphorylation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease." *Current Alzheimer Research* 3 (5): 449–63.

Misteli, T. 1996. "The Mammalian Golgi Apparatus during M-Phase." *Progress in Cell Cycle Research* 2: 267–77.

Miyata, Y., M. Hoshi, E. Nishida, Y. Minami, and H. Sakai. 1986. "Binding of Microtubule-Associated Protein 2 and Tau to the Intermediate Filament Reassembled from Neurofilament 70-kDa Subunit Protein. Its Regulation by Calmodulin." *The Journal of Biological Chemistry* 261 (28): 13026–30.

Mohamed, Nguyen-Vi, Thibaut Herrou, Vanessa Plouffe, Nicolas Piperno, and Nicole Leclerc. 2013. "Spreading of Tau Pathology in Alzheimer's Disease by Cell-to-Cell Transmission." *The European Journal of Neuroscience* 37 (12): 1939–48. doi:10.1111/ejn.12229.

Mohamed, Nguyen-Vi, Vanessa Plouffe, Gaudeline Rémillard-Labrosse, Emmanuel Planel, and Nicole Leclerc. 2014. "Starvation and Inhibition of Lysosomal Function Increased Tau Secretion by Primary Cortical Neurons." *Scientific Reports* 4 (July): 5715. doi:10.1038/srep05715.

Mondragón-Rodríguez, S., G. Perry, J. Luna-Muñoz, M. C. Acevedo-Aquino, and S. Williams. 2014. "Phosphorylation of Tau Protein at Sites Ser(396-404) Is One of the Earliest Events in Alzheimer's Disease and Down Syndrome." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 40 (2): 121–35. doi:10.1111/nan.12084.

Mondragón-Rodríguez, Siddhartha, Gustavo Basurto-Islas, Ismael Santa-Maria, Raúl Mena, Lester I. Binder, Jesús Avila, Mark A. Smith, George Perry, and Francisco García-Sierra. 2008. "Cleavage and Conformational Changes of Tau Protein Follow Phosphorylation during Alzheimer's Disease." *International Journal of Experimental Pathology* 89 (2): 81–90. doi:10.1111/j.1365-2613.2007.00568.x.

Montejo de Garcini, E., L. Serrano, and J. Avila. 1986. "Self Assembly of Microtubule Associated Protein Tau into Filaments Resembling Those Found in Alzheimer Disease." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141 (2): 790–96.

Morin-Ganet, M. N., A. Rambourg, S. B. Deitz, A. Franzusoff, and F. Képès. 2000. "Morphogenesis and Dynamics of the Yeast Golgi Apparatus." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1 (1): 56–68.

Morishima-Kawashima, M., M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, K. Titani, and Y. Ihara. 1995. "Proline-Directed and Non-Proline-Directed Phosphorylation of PHF-Tau." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (2): 823–29.

Morohashi, Yuichi, Zita Balklava, Matthew Ball, Helen Hughes, and Martin Lowe. 2010. "Phosphorylation and Membrane Dissociation of the ARF Exchange Factor GBF1 in Mitosis." *The Biochemical Journal* 427 (3): 401–12. doi:10.1042/BJ20091681.

Mourelatos, Z., H. Adler, A. Hirano, H. Donnemfeld, J. O. Gonatas, and N. K. Gonatas. 1990. "Fragmentation of the Golgi Apparatus of Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis Revealed by Organelle-Specific Antibodies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (11): 4393–95.

Mourelatos, Z., N. K. Gonatas, A. Stieber, M. E. Gurney, and M. C. Dal Canto. 1996. "The Golgi Apparatus of Spinal Cord Motor Neurons in Transgenic Mice Expressing Mutant Cu,Zn Superoxide Dismutase Becomes Fragmented in Early, Preclinical Stages of the Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (11): 5472–77.

Myllyharju, Johanna, and Kari I. Kivirikko. 2004. "Collagens, Modifying Enzymes and Their Mutations in Humans, Flies and Worms." *Trends in Genetics: TIG* 20 (1): 33–43. doi:10.1016/j.tig.2003.11.004.

Nakamura, N., C. Rabouille, R. Watson, T. Nilsson, N. Hui, P. Slusarewicz, T. E. Kreis, and G. Warren. 1995. "Characterization of a Cis-Golgi Matrix Protein, GM130." *The Journal of Cell Biology* 131 (6 Pt 2): 1715–26.

Nehls, S., E. L. Snapp, N. B. Cole, K. J. Zaal, A. K. Kenworthy, T. H. Roberts, J. Ellenberg, J. F. Presley, E. Siggia, and J. Lippincott-Schwartz. 2000. "Dynamics and Retention of Misfolded Proteins in Native ER Membranes." *Nature Cell Biology* 2 (5): 288–95. doi:10.1038/35010558.

Nickel, Walter, and Catherine Rabouille. 2009. "Mechanisms of Regulated Unconventional Protein Secretion." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (2): 148–55. doi:10.1038/nrm2617.

Nisticò, Robert, Marco Pignatelli, Sonia Piccinin, Nicola B. Mercuri, and Graham Collingridge. 2012. "Targeting Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease Therapy." *Molecular Neurobiology* 46 (3): 572–87. doi:10.1007/s12035-012-8324-3.

Noh, D. Y., S. H. Shin, and S. G. Rhee. 1995. "Phosphoinositide-Specific Phospholipase C and Mitogenic Signaling." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1242 (2): 99–113.

Noske, Andrew B., Adam J. Costin, Garry P. Morgan, and Brad J. Marsh. 2008. "Expedited Approaches to Whole Cell Electron Tomography and Organelle Mark-up in Situ in High-Pressure Frozen Pancreatic Islets." *Journal of Structural Biology* 161 (3): 298–313. doi:10.1016/j.jsb.2007.09.015.

Oprins, A., C. Rabouille, G. Posthuma, J. Klumperman, H. J. Geuze, and J. W. Slot. 2001. "The ER to Golgi Interface Is the Major Concentration Site of Secretory Proteins in the Exocrine Pancreatic Cell." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2 (11): 831–38.

Paladino, Simona, Daniela Sarnataro, Rudolf Pillich, Simona Tivodar, Lucio Nitsch, and Chiara Zurzolo. 2004. "Protein Oligomerization Modulates Raft Partitioning and Apical Sorting of GPI-Anchored Proteins." *The Journal of Cell Biology* 167 (4): 699–709. doi:10.1083/jcb.200407094.

Papasozomenos, S. C., and L. I. Binder. 1987. "Phosphorylation Determines Two Distinct Species of Tau in the Central Nervous System." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 8 (3): 210–26. doi:10.1002/cm.970080303.

Pardo, Raúl, Maria Molina-Calavita, Ghislaine Poizat, Guy Keryer, Sandrine Humbert, and Frédéric Saudou. 2010. "pARIS-Htt: An Optimised Expression Platform to Study Huntingtin Reveals Functional Domains Required for Vesicular Trafficking." *Molecular Brain* 3 (1): 17. doi:10.1186/1756-6606-3-17.

Pegueroles, Jordi, Eduard Vilaplana, Victor Montal, Frederic Sampedro, Daniel Alcolea, Maria Carmona-Iragui, Jordi Clarimon, et al. 2016. "Longitudinal Brain Structural Changes in Preclinical Alzheimer's Disease." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, September. doi:10.1016/j.jalz.2016.08.010.

Pérez, M., R. Cuadros, M. A. Smith, G. Perry, and J. Avila. 2000. "Phosphorylated, but

Not Native, Tau Protein Assembles Following Reaction with the Lipid Peroxidation Product, 4-Hydroxy-2-Nonenal.” *FEBS Letters* 486 (3): 270–74.

Pérez, Mar, Félix Hernández, Alberto Gómez-Ramos, Mark Smith, George Perry, and Jesús Avila. 2002. “Formation of Aberrant Phosphotau Fibrillar Polymers in Neural Cultured Cells.” *European Journal of Biochemistry* 269 (5): 1484–89.

Planel, Emmanuel, Alexis Bretteville, Li Liu, Laszlo Virag, Angela L. Du, Wai Haung Yu, Dennis W. Dickson, Robert A. Whittington, and Karen E. Duff. 2009. “Acceleration and Persistence of Neurofibrillary Pathology in a Mouse Model of Tauopathy Following Anesthesia.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (8): 2595–2604. doi:10.1096/fj.08-122424.

Planel, Emmanuel, Pavan Krishnamurthy, Tomohiro Miyasaka, Li Liu, Mathieu Herman, Asok Kumar, Alexis Bretteville, et al. 2008. “Anesthesia-Induced Hyperphosphorylation Detaches 3-Repeat Tau from Microtubules without Affecting Their Stability in Vivo.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (48): 12798–807. doi:10.1523/JNEUROSCI.4101-08.2008.

Plouffe, Vanessa, Nguyen-Vi Mohamed, Jessica Rivest-McGraw, Johanne Bertrand, Michel Lauzon, and Nicole Leclerc. 2012. “Hyperphosphorylation and Cleavage at D421 Enhance Tau Secretion.” *PloS One* 7 (5): e36873. doi:10.1371/journal.pone.0036873.

Polydoro, Manuela, Volodymyr I. Dzhala, Amy M. Pooler, Samantha B. Nicholls, A. Patrick McKinney, Laura Sanchez, Rose Pitstick, et al. 2014. “Soluble Pathological Tau in the Entorhinal Cortex Leads to Presynaptic Deficits in an Early Alzheimer’s Disease Model.” *Acta Neuropathologica* 127 (2): 257–70. doi:10.1007/s00401-013-1215-5.

Ponnambalam, Sreenivasan. 2003. “Protein Secretion and the Golgi Apparatus.” *Molecular Membrane Biology* 20 (2): 97–98. doi:10.1080/096878031000104935.

Pooler, Amy M, Emma C Phillips, Dawn H W Lau, Wendy Noble, and Diane P Hanger. 2013. “Physiological Release of Endogenous Tau Is Stimulated by Neuronal Activity.” *EMBO Reports* 14 (4): 389–94. doi:10.1038/embor.2013.15.

Poorkaj, P., T. D. Bird, E. Wijsman, E. Nemens, R. M. Garruto, L. Anderson, A. Andreadis, W. C. Wiederholt, M. Raskind, and G. D. Schellenberg. 1998. “Tau Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia.” *Annals of Neurology* 43 (6): 815–25. doi:10.1002/ana.410430617.

Posakony, J. W., J. M. England, and G. Attardi. 1977. "Mitochondrial Growth and Division during the Cell Cycle in HeLa Cells." *The Journal of Cell Biology* 74 (2): 468–91.

Prabhu, Yogikala, Patricia V. Burgos, Christina Schindler, Ginny G. Farías, Javier G. Magadán, and Juan S. Bonifacino. 2012. "Adaptor Protein 2-Mediated Endocytosis of the β -Secretase BACE1 Is Dispensable for Amyloid Precursor Protein Processing." *Molecular Biology of the Cell* 23 (12): 2339–51. doi:10.1091/mbc.E11-11-0944.

Prescott, A. R., T. Farmaki, C. Thomson, J. James, J. P. Paccaud, B. L. Tang, W. Hong, M. Quinn, S. Ponnambalam, and J. Lucocq. 2001. "Evidence for Prebudding Arrest of ER Export in Animal Cell Mitosis and Its Role in Generating Golgi Partitioning Intermediates." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2 (5): 321–35.

Prescott, Lansing M, John P Harley, and Donald A Klein. 2003. *Microbiologie*. Bruxelles: De Boeck.

Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal, and J. Lippincott-Schwartz. 1997. "ER-to-Golgi Transport Visualized in Living Cells." *Nature* 389 (6646): 81–85. doi:10.1038/38001.

Preuss, D., J. Mulholland, A. Franzusoff, N. Segev, and D. Botstein. 1992. "Characterization of the *Saccharomyces* Golgi Complex through the Cell Cycle by Immunoelectron Microscopy." *Molecular Biology of the Cell* 3 (7): 789–803.

Puthenveedu, Manojkumar A., Collin Bachert, Sapna Puri, Frederick Lanni, and Adam D. Linstedt. 2006. "GM130 and GRASP65-Dependent Lateral Cisternal Fusion Allows Uniform Golgi-Enzyme Distribution." *Nature Cell Biology* 8 (3): 238–48. doi:10.1038/ncb1366.

Qi, Haoling, François-Xavier Cantrelle, Houda Benhelli-Mokrani, Caroline Smet-Nocca, Luc Buée, Guy Lippens, Eliette Bonnefoy, Marie-Christine Galas, and Isabelle Landrieu. 2015. "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Interaction of Tau with DNA and Its Regulation by Phosphorylation." *Biochemistry* 54 (7): 1525–33. doi:10.1021/bi5014613.

Rabouille, C., N. Hui, F. Hunte, R. Kieckbusch, E. G. Berger, G. Warren, and T. Nilsson. 1995. "Mapping the Distribution of Golgi Enzymes Involved in the Construction of Complex Oligosaccharides." *Journal of Cell Science* 108 (Pt 4) (April): 1617–27.

Rabouille, Catherine, and Georg Haase. 2015. "Editorial: Golgi Pathology in

Neurodegenerative Diseases.” *Frontiers in Neuroscience* 9: 489. doi:10.3389/fnins.2015.00489.

Rabouille, Catherine, and Judith Klumperman. 2005. “Opinion: The Maturing Role of COPI Vesicles in Intra-Golgi Transport.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (10): 812–17. doi:10.1038/nrm1735.

Rabouille, Catherine, Vivek Malhotra, and Walter Nickel. 2012. “Diversity in Unconventional Protein Secretion.” *Journal of Cell Science* 125 (Pt 22): 5251–55. doi:10.1242/jcs.103630.

Rambourg, A. 1997. “Three-Dimensional Structure of the Golgi Apparatus in Mammalian Cells.” *Molecular and Cell Biology Updates*.

Rambourg, A., and Y. Clermont. 1986. “Tridimensional Structure of the Golgi Apparatus in Type A Ganglion Cells of the Rat.” *The American Journal of Anatomy* 176 (4): 393–409. doi:10.1002/aja.1001760403.

Rambourg, A., Y. Clermont, C. L. Jackson, and F. Képès. 1995. “Effects of Brefeldin A on the Three-Dimensional Structure of the Golgi Apparatus in a Sensitive Strain of *Saccharomyces Cerevisiae*.” *The Anatomical Record* 241 (1): 1–9. doi:10.1002/ar.1092410102.

Rambourg, A., Y. Clermont, L. Ovtracht, and F. Képès. 1995. “Three-Dimensional Structure of Tubular Networks, Presumably Golgi in Nature, in Various Yeast Strains: A Comparative Study.” *The Anatomical Record* 243 (3): 283–93. doi:10.1002/ar.1092430302.

Ramirez, Irene Barinaga-Rementeria, and Martin Lowe. 2009. “Golgins and GRASPs: Holding the Golgi Together.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (7): 770–79. doi:10.1016/j.semcdb.2009.03.011.

Raybin, D., and M. Flavin. 1977. “Enzyme Which Specifically Adds Tyrosine to the Alpha Chain of Tubulin.” *Biochemistry* 16 (10): 2189–94.

Rendón, Wilson O., Emma Martínez-Alonso, Mónica Tomás, Narcisa Martínez-Martínez, and José A. Martínez-Menárguez. 2013. “Golgi Fragmentation Is Rab and SNARE Dependent in Cellular Models of Parkinson’s Disease.” *Histochemistry and Cell Biology* 139 (5): 671–84. doi:10.1007/s00418-012-1059-4.

Reynolds, C. Hugh, Claire J. Garwood, Selina Wray, Caroline Price, Stuart Kellie, Timothy Perera, Marketa Zvelebil, et al. 2008. “Phosphorylation Regulates Tau Interactions

with Src Homology 3 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src Family Kinases.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (26): 18177–86. doi:10.1074/jbc.M709715200.

Roberson, E. D., K. Scarce-Levie, J. J. Palop, F. Yan, I. H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G.-Q. Yu, and L. Mucke. 2007. “Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid - Induced Deficits in an Alzheimer’s Disease Mouse Model.” *Science* 316 (5825): 750–54. doi:10.1126/science.1141736.

Robertson, Laura A., Kenneth L. Moya, and Kieran C. Breen. 2004. “The Potential Role of Tau Protein O-Glycosylation in Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 6 (5): 489–95.

Rothman, J. E. 1994. “Mechanisms of Intracellular Protein Transport.” *Nature* 372 (6501): 55–63. doi:10.1038/372055a0.

Rust, Heather L., and Paul R. Thompson. 2011. “Kinase Consensus Sequences: A Breeding Ground for Crosstalk.” *ACS Chemical Biology* 6 (9): 881–92. doi:10.1021/cb200171d.

Saini, Deepak Kumar, W. K. Ajith Karunarathne, Nataraju Angaswamy, Deepti Saini, Joon-Ho Cho, Vani Kalyanaraman, and Narasimhan Gautam. 2010. “Regulation of Golgi Structure and Secretion by Receptor-Induced G Protein By Complex Translocation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25): 11417–22. doi:10.1073/pnas.1003042107.

Saman, Sudad, WonHee Kim, Mario Raya, Yvonne Visnick, Suhad Miro, Sarmad Saman, Bruce Jackson, et al. 2012. “Exosome-Associated Tau Is Secreted in Tauopathy Models and Is Selectively Phosphorylated in Cerebrospinal Fluid in Early Alzheimer Disease.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (6): 3842–49. doi:10.1074/jbc.M111.277061.

Saraste, J., and E. Kuismanen. 1984. “Pre- and Post-Golgi Vacuoles Operate in the Transport of Semliki Forest Virus Membrane Glycoproteins to the Cell Surface.” *Cell* 38 (2): 535–49.

Saraste, J., G. E. Palade, and M. G. Farquhar. 1986. “Temperature-Sensitive Steps in the Transport of Secretory Proteins through the Golgi Complex in Exocrine Pancreatic Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (17):

6425–29.

Sawa, A., F. Oyama, M. Matsushita, and Y. Ihara. 1994. “Molecular Diversity at the Carboxyl Terminus of Human and Rat Tau.” *Brain Research. Molecular Brain Research* 27 (1): 111–17.

Scales, Timothy Me, Pascal Derkinderen, Kit-Yi Leung, Helen L. Byers, Malcolm A. Ward, Caroline Price, Ian N. Bird, et al. 2011. “Tyrosine Phosphorylation of Tau by the SRC Family Kinases Lck and Fyn.” *Molecular Neurodegeneration* 6 (January): 12. doi:10.1186/1750-1326-6-12.

Schraen-Maschke, Susanna, Claire-Marie Dhaenens, André Delacourte, and Bernard Sablonnière. 2004. “Microtubule-Associated Protein Tau Gene: A Risk Factor in Human Neurodegenerative Diseases.” *Neurobiology of Disease* 15 (3): 449–60. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.009.

Sengupta, A., J. Kabat, M. Novak, Q. Wu, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1998. “Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357 (2): 299–309. doi:10.1006/abbi.1998.0813.

Sergeant, Nicolas, Alexis Bretteville, Malika Hamdane, Marie-Laure Caillet-Boudin, Pierre Grognet, Stephanie Bombois, David Blum, et al. 2008. “Biochemistry of Tau in Alzheimer’s Disease and Related Neurological Disorders.” *Expert Review of Proteomics* 5 (2): 207–24. doi:10.1586/14789450.5.2.207.

Serrano, L., E. Montejo de Garcini, M. A. Hernández, and J. Avila. 1985. “Localization of the Tubulin Binding Site for Tau Protein.” *European Journal of Biochemistry* 153 (3): 595–600.

Sharma, Pranav, Rajat Varma, R. C. Sarasij, null Ira, Karine Gousset, G. Krishnamoorthy, Madan Rao, and Satyajit Mayor. 2004. “Nanoscale Organization of Multiple GPI-Anchored Proteins in Living Cell Membranes.” *Cell* 116 (4): 577–89.

Shifley, Emily T., and Susan E. Cole. 2008. “Lunatic Fringe Protein Processing by Proprotein Convertases May Contribute to the Short Protein Half-Life in the Segmentation Clock.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1783 (12): 2384–90. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.009.

Simón, Diana, Esther García-García, Alberto Gómez-Ramos, Juan Manuel Falcón-

Pérez, Miguel Díaz-Hernández, Félix Hernández, and Jesús Avila. 2012. “Tau Overexpression Results in Its Secretion via Membrane Vesicles.” *Neuro-Degenerative Diseases* 10 (1–4): 73–75. doi:10.1159/000334915.

Singh, T. J., T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1995. “Modulation of GSK-3-Catalyzed Phosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau by Non-Proline-Dependent Protein Kinases.” *FEBS Letters* 358 (1): 4–8.

Sjostrand, F. S., and V. Hanzon. 1954. “Ultrastructure of Golgi Apparatus of Exocrine Cells of Mouse Pancreas.” *Experimental Cell Research* 7 (2): 415–29.

Skoufias, D. A., T. L. Burgess, and L. Wilson. 1990. “Spatial and Temporal Colocalization of the Golgi Apparatus and Microtubules Rich in Detyrosinated Tubulin.” *The Journal of Cell Biology* 111 (5 Pt 1): 1929–37.

Smalheiser, Neil R. 2007. “Exosomal Transfer of Proteins and RNAs at Synapses in the Nervous System.” *Biology Direct* 2 (November): 35. doi:10.1186/1745-6150-2-35.

Small, Scott A., and Karen Duff. 2008. “Linking Abeta and Tau in Late-Onset Alzheimer’s Disease: A Dual Pathway Hypothesis.” *Neuron* 60 (4): 534–42. doi:10.1016/j.neuron.2008.11.007.

Smet-Nocca, Caroline, Malgorzata Broncel, Jean-Michel Wieruszeski, Caroline Tokarski, Xavier Hanouille, Arnaud Leroy, Isabelle Landrieu, Christian Rolando, Guy Lippens, and Christian P. R. Hackenberger. 2011. “Identification of O-GlcNAc Sites within Peptides of the Tau Protein and Their Impact on Phosphorylation.” *Molecular bioSystems* 7 (5): 1420–29. doi:10.1039/c0mb00337a.

Soo, Kai Y., Mark Halloran, Vinod Sundaramoorthy, Sonam Parakh, Reka P. Toth, Katherine A. Southam, Catriona A. McLean, et al. 2015. “Rab1-Dependent ER–Golgi Transport Dysfunction Is a Common Pathogenic Mechanism in SOD1, TDP-43 and FUS-Associated ALS.” *Acta Neuropathologica* 130 (5): 679–97. doi:10.1007/s00401-015-1468-2.

Sotgia, Federica, Babak Razani, Gloria Bonuccelli, William Schubert, Michela Battista, Hyangkyu Lee, Franco Capozza, et al. 2002. “Intracellular Retention of Glycosylphosphatidyl Inositol-Linked Proteins in Caveolin-Deficient Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 22 (11): 3905–26.

Spillantini, M. G., and M. Goedert. 1998. “Tau Protein Pathology in Neurodegenerative Diseases.” *Trends in Neurosciences* 21 (10): 428–33.

Stanley, P. 2011. "Golgi Glycosylation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (4): a005199–a005199. doi:10.1101/cshperspect.a005199.

Stieber, A., Z. Mourelatos, and N. K. Gonatas. 1996. "In Alzheimer's Disease the Golgi Apparatus of a Population of Neurons without Neurofibrillary Tangles Is Fragmented and Atrophic." *The American Journal of Pathology* 148 (2): 415–26.

Stieber, Anna, J.O. Gonatas, J.S. Moore, Andrew Bantly, H.-S. Yim, M.B. Yim, and N.K. Gonatas. 2004. "Disruption of the Structure of the Golgi Apparatus and the Function of the Secretory Pathway by Mutants G93A and G85R of Cu, Zn Superoxide Dismutase (SOD1) of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of the Neurological Sciences* 219 (1–2): 45–53. doi:10.1016/j.jns.2003.12.004.

Stoorvogel, W., H. J. Geuze, J. M. Griffith, and G. J. Strous. 1988. "The Pathways of Endocytosed Transferrin and Secretory Protein Are Connected in the Trans-Golgi Reticulum." *The Journal of Cell Biology* 106 (6): 1821–29.

Sultan, Audrey, Fabrice Nessler, Marie Violet, Séverine Bégard, Anne Loyens, Smail Talahari, Zeyni Mansuroglu, et al. 2011. "Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (6): 4566–75. doi:10.1074/jbc.M110.199976.

Sun, Kai-Hui, Yolanda de Pablo, Fabien Vincent, Emmanuel O. Johnson, Angela K. Chavers, and Kavita Shah. 2008. "Novel Genetic Tools Reveal Cdk5's Major Role in Golgi Fragmentation in Alzheimer's Disease." *Molecular Biology of the Cell* 19 (7): 3052–69. doi:10.1091/mbc.E07-11-1106.

Takei, Y., J. Teng, A. Harada, and N. Hirokawa. 2000. "Defects in Axonal Elongation and Neuronal Migration in Mice with Disrupted Tau and map1b Genes." *The Journal of Cell Biology* 150 (5): 989–1000.

Tang, Danming, Hebao Yuan, and Yanzhuang Wang. 2010. "The Role of GRASP65 in Golgi Cisternal Stacking and Cell Cycle Progression." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (6): 827–42. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01055.x.

Thal, Dietmar R., Udo Rüb, Mario Orantes, and Heiko Braak. 2002. "Phases of A Beta-Deposition in the Human Brain and Its Relevance for the Development of AD." *Neurology* 58 (12): 1791–1800.

Thinakaran, G., D. B. Teplow, R. Siman, B. Greenberg, and S. S. Sisodia. 1996.

“Metabolism of the ‘Swedish’ amyloid Precursor Protein Variant in neuro2a (N2a) Cells. Evidence That Cleavage at The ‘beta-Secretase’ site Occurs in the Golgi Apparatus.” *The Journal of Biological Chemistry* 271 (16): 9390–97.

Thyberg, J., and S. Moskalewski. 1999. “Role of Microtubules in the Organization of the Golgi Complex.” *Experimental Cell Research* 246 (2): 263–79. doi:10.1006/excr.1998.4326.

Torack, R. M. 1979. “Adult Dementia: History, Biopsy, Pathology.” *Neurosurgery* 4 (5): 434–42.

Torrent, L., and I. Ferrer. 2012. “PP2A and Alzheimer Disease.” *Current Alzheimer Research* 9 (2): 248–56.

Traub, L. M., and S. Kornfeld. 1997. “The Trans-Golgi Network: A Late Secretory Sorting Station.” *Current Opinion in Cell Biology* 9 (4): 527–33.

Trojanowski, J. Q., and V. M. Lee. 1994. “Paired Helical Filament Tau in Alzheimer’s Disease. The Kinase Connection.” *The American Journal of Pathology* 144 (3): 449–53.

Tu, Shichun, Shu-ichi Okamoto, Stuart A. Lipton, and Huaxi Xu. 2014. “Oligomeric A β -Induced Synaptic Dysfunction in Alzheimer’s Disease.” *Molecular Neurodegeneration* 9 (November): 48. doi:10.1186/1750-1326-9-48.

Turner, J. R., and A. M. Tartakoff. 1989. “The Response of the Golgi Complex to Microtubule Alterations: The Roles of Metabolic Energy and Membrane Traffic in Golgi Complex Organization.” *The Journal of Cell Biology* 109 (5): 2081–88.

Utton, M. A., A. Vandecandelaere, U. Wagner, C. H. Reynolds, G. M. Gibb, C. C. Miller, P. M. Bayley, and B. H. Anderton. 1997. “Phosphorylation of Tau by Glycogen Synthase Kinase 3 β Affects the Ability of Tau to Promote Microtubule Self-Assembly.” *The Biochemical Journal* 323 (Pt 3) (May): 741–47.

Utton, Michelle A., Wendy J. Noble, Josephine E. Hill, Brian H. Anderton, and Diane P. Hanger. 2005. “Molecular Motors Implicated in the Axonal Transport of Tau and Alpha-Synuclein.” *Journal of Cell Science* 118 (Pt 20): 4645–54. doi:10.1242/jcs.02558.

Varki, A. 1998. “Factors Controlling the Glycosylation Potential of the Golgi Apparatus.” *Trends in Cell Biology* 8 (1): 34–40.

Vingtdeux, Valérie, Nicolas Sergeant, and Luc Buée. 2012. “Potential Contribution of Exosomes to the Prion-like Propagation of Lesions in Alzheimer’s Disease.” *Frontiers in*

Physiology 3: 229. doi:10.3389/fphys.2012.00229.

Violet, Marie, Alban Chauderlier, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Meliza Sendid Chouala, Audrey Sultan, Elodie Marciniak, et al. 2015. “Prefibrillar Tau Oligomers Alter the Nucleic Acid Protective Function of Tau in Hippocampal Neurons in Vivo.” *Neurobiology of Disease* 82 (October): 540–51. doi:10.1016/j.nbd.2015.09.003.

Violet, Marie, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Audrey Sultan, Alban Chauderlier, Raphaëlle Caillierez, Smail Talahari, et al. 2014. “A Major Role for Tau in Neuronal DNA and RNA Protection in Vivo under Physiological and Hyperthermic Conditions.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 84. doi:10.3389/fncel.2014.00084.

Von Bartheld, Christopher S., and Amy L. Altick. 2011. “Multivesicular Bodies in Neurons: Distribution, Protein Content, and Trafficking Functions.” *Progress in Neurobiology* 93 (3): 313–40. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.003.

Wang, J. Z., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1996. “Restoration of Biological Activity of Alzheimer Abnormally Phosphorylated Tau by Dephosphorylation with Protein Phosphatase-2A, -2B and -1.” *Brain Research. Molecular Brain Research* 38 (2): 200–208.

Wang, Sunxi, Jin-Sook Lee, Nicole Bishop, Aleksandar Jeremic, Won Jin Cho, Xuequn Chen, Guangzhao Mao, Douglas J. Taatjes, and Bhanu P. Jena. 2012. “3D Organization and Function of the Cell: Golgi Budding and Vesicle Biogenesis to Docking at the Porosome Complex.” *Histochemistry and Cell Biology* 137 (6): 703–18. doi:10.1007/s00418-012-0948-x.

Wang, Xiaodong, Jeanne Matteson, Yu An, Bryan Moyer, Jin-San Yoo, Sergei Bannykh, Ian A. Wilson, John R. Riordan, and William E. Balch. 2004. “COPII-Dependent Export of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator from the ER Uses a Di-Acidic Exit Code.” *The Journal of Cell Biology* 167 (1): 65–74. doi:10.1083/jcb.200401035.

Wang, Yanzhuang, and Joachim Seemann. 2011. “Golgi Biogenesis.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (10): a005330. doi:10.1101/cshperspect.a005330.

Wang, Yanzhuang, Jen-Hsuan Wei, Blaine Bisel, Danming Tang, and Joachim Seemann. 2008. “Golgi Cisternal Unstacking Stimulates COPI Vesicle Budding and Protein Transport.” *PloS One* 3 (2): e1647. doi:10.1371/journal.pone.0001647.

Webster, D. R., G. G. Gundersen, J. C. Bulinski, and G. G. Borisy. 1987. “Assembly and Turnover of Detyrosinated Tubulin in Vivo.” *The Journal of Cell Biology* 105 (1): 265–

76.

Wehland, J., M. Henkart, R. Klausner, and I. V. Sandoval. 1983. "Role of Microtubules in the Distribution of the Golgi Apparatus: Effect of Taxol and Microinjected Anti-Alpha-Tubulin Antibodies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (14): 4286–90.

Weidman, P., R. Roth, and J. Heuser. 1993. "Golgi Membrane Dynamics Imaged by Freeze-Etch Electron Microscopy: Views of Different Membrane Coatings Involved in Tubulation versus Vesiculation." *Cell* 75 (1): 123–33.

Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. "A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5): 1858–62.

Williams, D., S. W. Hicks, C. E. Machamer, and J. E. Pessin. 2006. "Golgin-160 Is Required for the Golgi Membrane Sorting of the Insulin-Responsive Glucose Transporter GLUT4 in Adipocytes." *Molecular Biology of the Cell* 17 (12): 5346–55. doi:10.1091/mbc.E06-05-0386.

Wischik, C. M., M. Novak, P. C. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar, and R. A. Crowther. 1988. "Structural Characterization of the Core of the Paired Helical Filament of Alzheimer Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (13): 4884–88.

Wolfe, Devin M., Ju-Hyun Lee, Asok Kumar, Sooyeon Lee, Samantha J. Orenstein, and Ralph A. Nixon. 2013. "Autophagy Failure in Alzheimer's Disease and the Role of Defective Lysosomal Acidification." *The European Journal of Neuroscience* 37 (12): 1949–61. doi:10.1111/ejn.12169.

Wolfe, Michael S. 2009. "Tau Mutations in Neurodegenerative Diseases." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (10): 6021–25. doi:10.1074/jbc.R800013200.

Wu, Xiaohua, Richard A Steet, Ognian Bohorov, Jaap Bakker, John Newell, Monty Krieger, Leo Spaapen, Stuart Kornfeld, and Hudson H Freeze. 2004. "Mutation of the COG Complex Subunit Gene COG7 Causes a Lethal Congenital Disorder." *Nature Medicine* 10 (5): 518–23. doi:10.1038/nm1041.

Xiang, Yi, and Yanzhuang Wang. 2011. "New Components of the Golgi Matrix." *Cell and Tissue Research* 344 (3): 365–79. doi:10.1007/s00441-011-1166-x.

Xiang, Yi, Xiaoyan Zhang, David B. Nix, Toshihiko Katoh, Kazuhiro Aoki, Michael Tiemeyer, and Yanzhuang Wang. 2013. "Regulation of Protein Glycosylation and Sorting by the Golgi Matrix Proteins GRASP55/65." *Nature Communications* 4: 1659. doi:10.1038/ncomms2669.

Xu, Ying, Sen Takeda, Takao Nakata, Yasuko Noda, Yosuke Tanaka, and Nobutaka Hirokawa. 2002. "Role of KIFC3 Motor Protein in Golgi Positioning and Integration." *The Journal of Cell Biology* 158 (2): 293–303. doi:10.1083/jcb.200202058.

Yamada, Kaoru, John R. Cirrito, Floy R. Stewart, Hong Jiang, Mary Beth Finn, Brandon B. Holmes, Lester I. Binder, et al. 2011. "In Vivo Microdialysis Reveals Age-Dependent Decrease of Brain Interstitial Fluid Tau Levels in P301S Human Tau Transgenic Mice." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (37): 13110–17. doi:10.1523/JNEUROSCI.2569-11.2011.

Yang, L. S., and H. Ksiezak-Reding. 1995. "Calpain-Induced Proteolysis of Normal Human Tau and Tau Associated with Paired Helical Filaments." *European Journal of Biochemistry* 233 (1): 9–17.

Yoo, Jin-San, Bryan D. Moyer, Sergei Bannykh, Hyeon-Mi Yoo, John R. Riordan, and William E. Balch. 2002. "Non-Conventional Trafficking of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator through the Early Secretory Pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13): 11401–9. doi:10.1074/jbc.M110263200.

Yoshiyama, Yasumasa, Bin Zhang, Jennifer Bruce, John Q. Trojanowski, and Virginia M.-Y. Lee. 2003. "Reduction of Detyrosinated Microtubules and Golgi Fragmentation Are Linked to Tau-Induced Degeneration in Astrocytes." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (33): 10662–71.

Yu, Chun-Hui, Tong Si, Wei-Hui Wu, Jia Hu, Jin-Tang Du, Yu-Fen Zhao, and Yan-Mei Li. 2008. "O-GlcNAcylation Modulates the Self-Aggregation Ability of the Fourth Microtubule-Binding Repeat of Tau." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375 (1): 59–62. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.101.

Zhang, L., R. Sheng, and Z. Qin. 2009. "The Lysosome and Neurodegenerative Diseases." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 41 (6): 437–45. doi:10.1093/abbs/gmp031.

Zheng, Hui, and Edward H. Koo. 2006. "The Amyloid Precursor Protein: Beyond Amyloid." *Molecular Neurodegeneration* 1 (July): 5. doi:10.1186/1750-1326-1-5.

Zhou, Zhi-dong, Christine Hui-shan Chan, Quan-hong Ma, Xiao-hong Xu, Zhi-cheng Xiao, and Eng-king Tan. 2011. "The Roles of Amyloid Precursor Protein (APP) in Neurogenesis: Implications to Pathogenesis and Therapy of Alzheimer Disease." *Cell Adhesion & Migration* 5 (4): 280–92.

Zlokovic, Berislav V. 2011. "Neurovascular Pathways to Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Other Disorders." *Nature Reviews Neuroscience*, November. doi:10.1038/nrn3114.

