

Université de Montréal

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

par

Vanessa Plouffe

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

en Pathologie et Biologie Cellulaire

option système nerveux

Décembre, 2011

© Vanessa Plouffe, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

La sécrétion de la protéine Tau : nouveau mécanisme de propagation de la pathologie de
Tau dans la maladie d'Alzheimer

Présenté par :
Vanessa Plouffe

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Adriana Di Polo
président-rapporteur

Dr Nicole Leclerc
directeur de recherche

Dr Roger Lippé
membre du jury

RÉSUMÉ

Tau est une protéine associée aux microtubules enrichie dans l'axone. Dans la maladie d'Alzheimer, Tau devient anormalement hyperphosphorylée, s'accumule dans le compartiment somato-dendritique et s'agrège pour former des enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs). Ces NFTs se propagent dans le cerveau dans un ordre bien précis. Ils apparaissent d'abord dans le cortex transenthorinal pour ensuite se propager là où ces neurones projettent, c'est-à-dire au cortex entorhinal. Les NFTs s'étendent ensuite à l'hippocampe puis à différentes régions du cortex et néocortex. De plus, des études récentes ont démontré que la protéine Tau peut être sécrétée par des lignées neuronales et que lorsqu'on injecte des agrégats de Tau dans un cerveau de souris, ceux-ci peuvent pénétrer dans les neurones et induire la pathologie de Tau dans le cerveau. Ces observations ont mené à l'hypothèse que la protéine Tau pathologique pourrait être sécrétée par les neurones, pour ensuite être endocytée par les cellules avoisinantes et ainsi propager la maladie. L'objectif de la présente étude était donc de prouver la sécrétion de la protéine Tau par les neurones et d'identifier par quelle voie elle est sécrétée. Nos résultats ont permis de démontrer que la protéine Tau est sécrétée par des neurones corticaux de souris de type sauvage ainsi que dans un modèle de surexpression dans des cellules HeLa et PC12. Nos résultats indiquent que la sécrétion de Tau se ferait par les autophagosomes. Finalement, nous avons démontré que la protéine Tau sécrétée est déphosphorylée et clivée par rapport à la protéine Tau intracellulaire non sécrétée.

Mots clés : Tau, Alzheimer, sécrétion, phosphorylation, autophagie, exosomes, tauopathies

SUMMARY

Tau, a microtubule-associated protein, is enriched in the axon. In Alzheimer's disease, Tau becomes hyperphosphorylated, redistributes to the somato-dendritic compartment and forms aggregates called neurofibrillary tangles (NFTs). The NFTs propagate in a predictable manner in particular neuronal networks. Indeed, they appear in the trans-entorhinal region and then propagate to the entorhinal cortex where the trans-entorhinal cortex projects. Then, the NFTs propagate to the hippocampus and to different regions of the cortex and neocortex. Recent studies have reported that Tau can be secreted by neuronal cell lines. Besides, when aggregates of Tau protein were injected in mouse brain, they could enter neurons and induced Tau pathology. Based on those observations, it was speculated that Tau could be secreted by neurons and then captured by neighbouring cells to propagate Tau pathology in the brain. The goal of the present study was to prove that Tau can be secreted by neurons and to find the secretory pathway involved in Tau secretion. Moreover, the phosphorylation state of Tau protein was examined and compared to intracellular non-secreted Tau. Our results showed that Tau is secreted by cortical neurons isolated from wild-type mice and by HeLa and PC12 cells overexpressing human Tau. Our results also indicated that autophagosomes would be involved in Tau secretion. Finally, we found that secreted Tau was dephosphorylated and cleaved compared to the non-secreted intracellular Tau.

Keywords: Tau, Alzheimer, secretion, phosphorylation, autophagy, exosomes, tauopathies

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xii
1. INTRODUCTION	1
1.1. Maladie d’Alzheimer	1
1.1.1. Définition et symptômes	1
1.1.2. Impact socio-économique	1
1.1.3. Biologie de la maladie.....	2
1.1.3.1. Théorie de la cascade amyloïde	3
1.1.3.2. Théorie Tau	7
1.1.3.2.1. Hyperphosphorylation.....	8
1.1.3.2.2. Relocalisation somato-dendritique de la protéine Tau dans la MA	9
1.1.3.2.3. Agrégation de la protéine Tau.....	12
1.1.3.2.4. Pathologie de Tau.....	12
1.2. La protéine Tau	15
1.2.1. Structure	15
1.2.2. Localisation	20
1.2.3. Fonctions.....	20
1.2.3.1. Liaison au cytosquelette.....	20
1.2.3.2. Liaison aux membranes	22
1.2.3.3. Signalisation.....	23
1.2.3.4. Liaison à l’ADN.....	24
1.2.4. Phosphorylation de Tau	24
1.2.4.1. Rôle physiologique	24
1.2.4.2. Sites de phosphorylation	25
1.2.4.3. Pathologies d’hyperphosphorylation.....	25
1.2.5. Tauopathies	27

1.2.5.1. Les mutations de Tau	27
1.2.5.2. Les modèles animaux.....	28
1.2.5.3. Liquide cérébro-spinal	29
1.3. Sécrétion.....	31
1.3.1. Voie conventionnelle	32
1.3.2. Voies non-conventionnelles.....	32
1.4. Objectifs de l'étude	41
2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	43
2.1. PLASMIDES D'EXPRESSION	43
2.2. CULTURES CELLULAIRES	43
2.3. TRANSFECTION.....	44
2.4. IMMUNOBUVARDAGE	44
2.5. IMMUNOPRÉCIPITATION.....	45
2.6. QUANTIFICATION PAR DENSITOMÉTRIE DU SIGNAL DÉTECTÉ.....	47
2.7. TRAITEMENTS	47
2.8. TEST DE CYTOTOXICITÉ	48
3. RÉSULTATS	50
3.1. La protéine Tau est sécrétée dans un modèle de cellules HeLa.....	50
3.1.1. Expression de la GFP-Tau4R.....	50
3.1.2. Sécrétion de la GFP-Tau4R	50
3.1.3. Validation de la technique de détection de la mort cellulaire	54
3.1.4. Tau emprunte une voie de sécrétion non-conventionnelle.....	59
3.1.5. La protéine Tau sécrétée est déphosphorylée comparativement à la protéine Tau intracellulaire	63
3.1.6. L'état de phosphorylation de Tau influence sa sécrétion	66
3.1.7. La protéine Tau sécrétée est clivée en C-terminal	69
3.2. La protéine Tau est sécrétée par les cellules PC12	72
3.2.1. Expression de la GFP-Tau4R dans les cellules PC12 stablement transfectées..	72
3.2.2. Investigation des voies de sécrétion empruntées par Tau	75
3.3. Sécrétion de la protéine Tau endogène par des neurones corticaux de souris de type sauvage.....	80
4. DISCUSSION	85
4.1. Résumé des résultats	85

4.2. Sécrétion de la protéine Tau.....	85
4.2.1. Tau est sécrétée par 3 types cellulaires différents.....	86
4.2.2. Investigation du mode de sécrétion emprunté par Tau	87
4.2.2.1. Tau emprunte une ou des voies de sécrétion non-conventionnelles	87
4.2.2.2. Induction d'une augmentation de calcium intracellulaire.....	88
4.2.2.3. Déficiences de l'autophagie dans la maladie d'Alzheimer	89
4.3. Caractérisation de la protéine Tau sécrétée.....	91
4.3.1. La protéine Tau sécrétée est clivée en C-terminal	91
4.3.2. Déphosphorylation de la protéine Tau sécrétée	93
4.4. L'hyperphosphorylation de Tau favorise sa sécrétion	94
4.5. Implications de la sécrétion de Tau dans la MA.....	95
4.6. Perspectives futures.....	97
4.7. Conclusion	98
5. LISTE DE RÉFÉRENCES	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Liste des anticorps dirigés contre Tau et dilution utilisée pour immunobuvardage	46
Tableau II. Constituants des solutions K5 et K50 dilués dans l'eau.	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Séquence de clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde.....	4
Figure 2. Cascade de phosphorylation de la protéine Tau.....	10
Figure 3. Schéma des différentes isoformes de la protéine Tau humaine du système nerveux central générées par épissage alternatif.	16
Figure 4. Schéma de la plus longue isoforme de Tau et de ses domaines.	18
Figure 5 .Voie de sécrétion conventionnelle.....	33
Figure 6. Voies de sécrétion non-conventionnelles.....	35
Figure 7. Modèle de sécrétion de la protéine Annexine A2 lorsqu'attachée à la surface d'une vésicule.....	39
Figure 8. Sécrétion de la protéine GFP-Tau4R dans des cellules HeLa.	52
Figure 9. Tests de différentes méthodes de détection de la mort cellulaire.	56
Figure 10. Mode de sécrétion de la protéine Tau par les cellules HeLa.....	61
Figure 11. État de phosphorylation de la protéine Tau sécrétée comparativement à la protéine Tau intracellulaire.	64
Figure 12. Effet de la phosphorylation de Tau sur sa sécrétion.	67
Figure 13. Marquage du N- et C-terminal de Tau ainsi que du MTBD dans des cellules HeLa transfectées avec la GFP-Tau4R et la GFP-E12.....	70
Figure 14. Sécrétion de Tau par des cellules PC12 stablement transfectées avec la GFP-Tau4R.....	73
Figure 15. Effet de divers traitements sur la sécrétion de Tau par des cellules PC12 stablement transfectées avec GFP-Tau4R.	78
Figure 16. Effets de divers traitements sur la sécrétion de Tau par des neurones corticaux de souris de type sauvage.....	83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a. : acide aminé

ACBP : «*acetyl coenzyme A-binding protein*», protéine de liaison à l'acetyl coenzyme A

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AP-1 : «*activator protein 1*», protéine activatrice 1

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

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

BF : bruit de fond

BFA : brefeldin A

CBD: «*corticobasal degeneration*», dégénération corticobasale

CFTR : «*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*», régulateur de conductance transmembranaire fibrose kystique

CJD : «*Creutzfeld Jacob disease*», maladie de Creutzfeld Jacob

CMVs : corps multi-vésiculaires

COP I et II : «*coat protein complex I and II*», complexe de recouvrement de protéine I et II

DMSO : dimethyl sulfoxide

EC : extracellulaire

FBS : «*fetal bovin serum*», sérum bovin foetal

FTD : «*frontotemporal dementia*», démence frontotemporale

FTDP-17 : «*frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*», démence fronto-temporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17

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

HS : «*Horse serum*», sérum de cheval

IC : intracellulaire

IgG : immunoglobulines G

IL-1 β : interleukine 1 β

IP : immunoprécipitation

KO : knockout

L : lysat

LBD : «*Lewy body dementia*», démence de corps de Lewy

LCS : liquide cérébro-spinal

LDH : lactate déhydrogénase

Leup : leupeptine

M : milieu

MA : maladie d'Alzheimer

MAP : «*microtubule-associated protein*», protéine associée aux microtubules

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

mTOR : «*mammalian target of rapamycin*», cible de la rapamycine de mammifère

MTs : microtubules

NFTs : «*neurofibrillary tangles*», agrégats neuro-fibrillaires

NGF : «*neuronal growth factor*», facteur de croissance neuronal

PDPK : «*proline-directed protein kinases*», protéine kinase dirigée par une proline

PHFs : «*paired helical filaments*», filaments pairés hélicaux

PP2A : protéine phosphatase 2A

Pro : proline

PS : préséniline

pTau : Tau phosphorylée

R : répétition

Rapa : rapamycine

RE : réticulum endoplasmique

Ser ou S (suivi d'un nombre) : sérine

T : témoin

Thap : thapsigargine

Thr ou T (suivi d'un nombre) : thréonine

TM : transmembranaire

TNAP : «*Tissue non-specific alkaline phosphatase*», phosphatase tissu non-spécifique

tTau : Tau totale

Tyr : tyrosine

VAs : vacuoles autophagiques

4R : 4 répétitions

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les personnes suivantes :

- Le Dr Nicole Leclerc, ma directrice de recherche, pour m'avoir donné la chance de faire mes études de maîtrise dans son laboratoire, pour sa disponibilité, son enthousiasme contagieux pour la recherche, son sens de l'humour et ses bons conseils.
- Les étudiants et membres du laboratoire, présent et passé, Johanne Bertrand, Nguyen- Vi Mohamed, Jessica Mc Graw-Rivest, Patrick Sénéchal et Grégoire Morisse. Merci à tous et toutes, pour votre aide au niveau scientifique, votre bonne humeur et votre amitié. Un merci tout spécial à Vi pour l'aide incroyable qu'elle m'a donné afin que je puisse terminer mes recherches dans le cadre de ma maîtrise.
- Mes parrains de maîtrise, le Dr Roger Lippé et le Dr Jannic Boehm, pour leurs conseils éclairés pendant mes études.
- Un merci tout spécial à Michel Lauzon, pour son aide technique sur la microscopie et les logiciels informatiques, ainsi que pour la bonne humeur qu'il transporte continuellement avec lui.
- Ma sœur Anik pour son aide et ses conseils lors de l'écriture de ce mémoire.

Je tiens également à remercier le groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC) pour son soutien financier qui m'a permis de me consacrer totalement à mes études tout au long de ma maîtrise.

1. INTRODUCTION

1.1. Maladie d'Alzheimer

1.1.1. Définition et symptômes

La maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois en 1907 par un neurologue allemand du même nom. La MA est une maladie neurodégénérative qui conduit à la démence. Les personnes atteintes vont développer plusieurs problèmes cognitifs dont le plus connu est la perte de mémoire. La maladie se caractérise aussi par des pertes au niveau du jugement, du raisonnement, à des changements au niveau de l'humeur, des comportements et de la personnalité. Les patients peuvent aussi développer des problèmes de langage allant même jusqu'à perdre cette capacité dans les derniers stades de la maladie. Bref, cette démence affecte plusieurs capacités, ce qui traduit un dysfonctionnement neuronal et ultimement une large perte neuronale. On sait entre autre que plusieurs régions du cerveau, tels l'hippocampe et le cortex entorhinal, deviennent atrophiées chez ces personnes. Cette atrophie est probablement imputable à la diminution de densité synaptique, au rétrécissement des neurones, ainsi qu'à la perte neuronale (Tartaglia, Rosen et al. 2011). Les deux principales lésions pathologiques retrouvées dans la MA sont les plaques séniles présentes à l'extérieur des cellules ainsi que les NFTs intracellulaires.

1.1.2. Impact socio-économique

À l'heure actuelle, la MA et les démences apparentées touchent ½ million de Canadiens. Avec la population vieillissante et les «*babyboomers*» maintenant dans la soixantaine, le nombre de cas devrait atteindre les 1,1 M de Canadiens d'ici 2038. Le grave problème avec cette situation est le fait qu'il n'existe en ce moment aucune cure à la maladie, les seuls médicaments servent à réduire les symptômes et non à freiner la pathologie. En 2008, les familles canadiennes devant s'occuper d'un proche souffrant de MA ont dû passer 231 millions d'heures non-rémunérées à soigner leurs proches malades. En plus de tout ce travail, on estime que la société doit déboursier 15 milliards de dollars par année pour les soins de santé liés aux patients atteints d'une démence, dont la MA représente 63% des cas. D'ici 2038, ce fardeau économique devrait s'élever à environ 153

milliards, soit dix fois plus qu'à l'heure actuelle. L'omniprésence de cette maladie dans la société d'aujourd'hui, ainsi que le fardeau économique et social qu'elle représente, fait de la MA un problème de santé publique majeur (Statistiques tirées du site www.alzheimer.ca, consulté le 2011-10-20).

1.1.3. Biologie de la maladie

Alois Alzheimer a été le premier à décrire les deux particularités histologiques présentes dans la MA : les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs). Ce n'est que plusieurs années plus tard que l'on découvrait que le principal composant des plaques était le peptide A β , produit du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Glennner and Wong 1984), et que les NFTs étaient composés de la protéine Tau hyperphosphorylée (Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986). Bien vite, le peptide A β s'est vu offrir le rôle de déclencheur de la MA. En effet, il avait été découvert que des mutations dans le gène codant APP provoquaient une forme rare de la maladie, la MA précoce, se déclenchant beaucoup plus tôt chez les personnes atteintes, mais reproduisant les caractéristiques pathologiques de la MA courante (Goate, Chartier-Harlin et al. 1991). Des mutations dans le gène de Tau aussi ont par la suite été découvertes, mais celles-ci provoquaient l'apparition de démence fronto-temporale (FTD) (Hutton, Lendon et al. 1998), pathologie différente de la MA dans laquelle aucune plaque amyloïde ne se développe. De plus, d'autres mutations pouvant causer la MA précoce ont été identifiées dans les gènes de préséniline 1 et 2 (Levy-Lahad, Wasco et al. 1995; Rogaev, Sherrington et al. 1995; Sherrington, Rogaev et al. 1995), mutations ayant un effet important sur le clivage de la protéine APP et sur la formation de plaques amyloïdes. Toutes ces observations ont alors mené à la théorie de la "cascade amyloïde", modèle dans lequel l'élévation du peptide A β dans le cerveau est l'événement pathologique premier menant à la MA, causant l'hyperphosphorylation de Tau et les autres caractéristiques pathologiques observées dans la maladie.

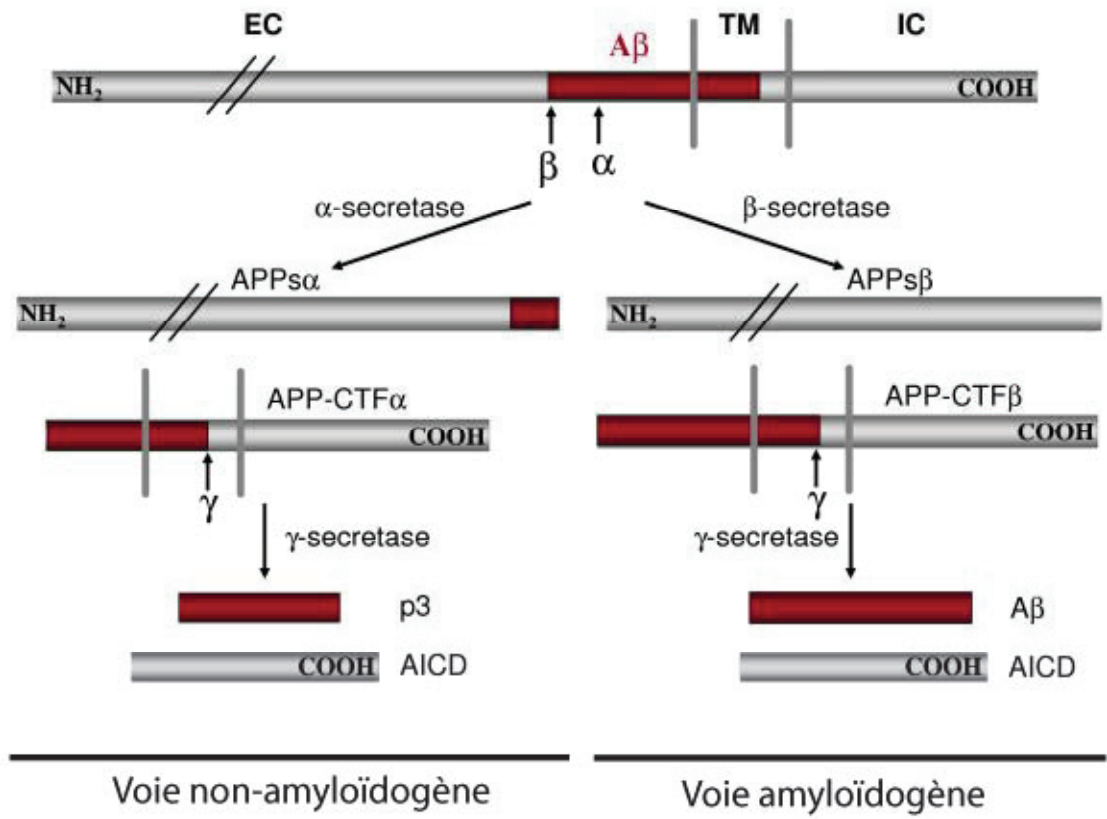
1.1.3.1. Théorie de la cascade amyloïde

L'APP est exprimée de façon ubiquitaire et son gène est situé sur le chromosome 21 (Goldgaber, Lerman et al. 1987; Robakis, Wisniewski et al. 1987; Goate, Chartier-Harlin et al. 1991). Cette protéine transmembranaire de type I est composée d'une importante région extracellulaire, appelée ectodomaine, d'un domaine transmembranaire unique ainsi que d'un court fragment intracellulaire (Figure 1, p.4). Bien qu'une multitude d'études aient été effectuées sur cette protéine, la vaste panoplie de ses fonctions ne semble pas avoir été entièrement élucidée. On sait entre autre que l'ectodomaine de la protéine a un rôle à jouer dans l'adhésion cellulaire, APP étant co-localisée avec les intégrines aux sites d'adhésion cellulaire dans l'axone (Storey, Spurck et al. 1996; Yamazaki, Koo et al. 1997). Cette portion de l'APP a aussi une fonction au niveau de la pousse neuritique et de la synaptogenèse. Le domaine intracellulaire de l'APP peut tant qu'à lui agir sur l'apoptose, le transport axonal, la migration cellulaire et le remodelage des synapses (Zheng and Koo 2006). Il a aussi un rôle dans certaines voies de signalisation cellulaire, de par sa translocation au noyau et sa fonction de régulateur de la transcription (Cupers, Orleans et al. 2001; Gao and Pimplikar 2001; Kimberly, Zheng et al. 2001). Il a de plus la capacité d'interagir avec plusieurs autres protéines, ce qui lui permet, par exemple, de s'impliquer dans la régulation de la motilité cellulaire et d'agir sur la dynamique du cône de croissance (Sabo, Ikin et al. 2001; Sabo, Ikin et al. 2003).

Les diverses fonctions de l'APP peuvent se faire lorsque la protéine est complète ou suite à son clivage. La protéine est le substrat de trois sécrétases majeures, soit l' α -, la β - et la γ -sécrétase. L' α -sécrétase est représentée majoritairement par ADAM 9, 10 et 17 (Buxbaum, Liu et al. 1998; Allinson, Parkin et al. 2003), alors que la β -sécrétase principale de l'APP est BACE1 (Sinha, Anderson et al. 1999; Vassar, Bennett et al. 1999; Yan, Bienkowski et al. 1999; Lau, McLoughlin et al. 2000). La γ -sécrétase tant qu'à elle consiste en un complexe de haut poids moléculaire qui est composé d'au moins quatre éléments majeurs : la préséniline (PS, PS1 ou PS2), la nicastrine, l'APH-1 et la PEN-2 (Kimberly, LaVoie et al. 2003; Takasugi, Tomita et al. 2003). L'APP peut être métabolisée par deux voies : la voie amyloïdogène et la voie non-amyloïdogène (Figure 1, p.4) (Evin and Weidemann 2002; Nunan and Small 2002; Ling, Morgan et al. 2003). La voie amyloïdogène résulte en la formation du peptide A β , le composant majeur des plaques séniles. Celui-ci est produit lorsque l'APP est clivée par la β -sécrétase, puis par la

Figure 1. Séquence de clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde.

Représentation schématique de la séquence de clivage de l'APP. La protéine précurseur de l'amyloïde peut être clivée par l' α -sécrétase, et ensuite, par la γ -sécrétase pour donner les fragments p3 et AICD non-impliqués dans la pathologie de la MA. Ce processus de clivage est la voie non-amyloïdogène. L'APP peut alternativement être clivée par la β -sécrétase suivie par la γ -sécrétase pour donner les fragments $A\beta$ et AICD. Cette voie est appelée amyloïdogène, car elle mène à la formation du peptide toxique $A\beta$, illustré en rouge. EC: extracellulaire, TM: transmembranaire, IC: intracellulaire.



Modifié de Zheng and Koo, 2006, Molecular Neurodegeneration, 1:5

γ -sécrétase. La cascade non-amyloïdogène tant qu'à elle ne conduit pas à la formation du peptide A β pathogène et est induit par l'action des sécrétases α et γ . Dans des conditions non pathologiques, 95% du clivage de l'APP se fait grâce à l' α -sécrétase (Esch, Keim et al. 1990). Par contre, la majorité des mutations de l'APP observées dans la MA sont près des sites de clivage de la protéine et résultent en une augmentation du clivage par la β - et la γ -sécrétase, provoquant de ce fait une augmentation de production du peptide A β .

Le peptide A β se retrouve dans la cellule sous forme de monomère ou, lorsqu'il adopte une structure en feuillet β , il peut s'assembler en dimère, trimère et oligomère de plus grand ordre formant éventuellement des protofibrilles pour finalement former les fibrilles matures que l'on retrouve dans les plaques amyloïdes (Palop and Mucke 2010). Les protofibrilles sont composés de 15 à 40 monomères qui vont le plus souvent s'associer à des cations pour stabiliser leur assemblage (Caughey and Lansbury 2003). Les fibrilles matures peuvent par la suite s'accumuler dans le milieu extracellulaire autour d'un noyau de nucléation dont la composition est encore controversée (Harper and Lansbury 1997; Hayashi, Kimura et al. 2004; Kihara, Chatani et al. 2005; Yanagisawa 2005), pour ainsi former les plaques amyloïdes. Ces plaques se retrouvent sous deux formes différentes; la première est composée des fibrilles de A β disposés en feuillets bêta et se nomme les plaques neuritiques (Benzing, Ikonovic et al. 1993). La seconde est composé de plaques diffuses formées de dépositions d'A β qui contiennent très peu ou aucun fibrille (Yamaguchi, Hirai et al. 1988).

Plusieurs problèmes pathologiques sont imputés au peptide A β . Des études ont démontré *in vitro* et *in vivo* la neurotoxicité des fibrilles amyloïdes bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore bien connus (Caughey and Lansbury 2003). Les hypothèses les plus étudiées font état de la perturbation de l'homéostasie du calcium, de la neuroinflammation et de l'induction d'un stress oxydant par ces fibrilles (Mattson, Cheng et al. 1992; Miranda, Opazo et al. 2000; Morgan, Colombres et al. 2004). Il a aussi été démontré que les oligomères d'A β provoquent une diminution de la force de transmission synaptique glutamatergique, de la plasticité synaptique et amènent la perte de ces dernières (Chapman, White et al. 1999; Hsia, Masliah et al. 1999; Walsh, Klyubin et al. 2002). Les oligomères vont diminuer la transmission synaptique excitative en réduisant le nombre de récepteurs AMPA et NMDA à la surface cellulaire par endocytose (Kamenetz, Tomita et al. 2003; Hsieh, Boehm et al. 2006; Shankar, Bloodgood et al. 2007). Il a de plus été démontré

que le peptide A β peut affaiblir la potentialisation à long terme et augmenter la dépression à long terme, bien que les mécanismes de ces modulations ne sont pas encore compris (Palop and Mucke 2010). Toutes ces observations pourraient expliquer la déstabilisation du réseau neuronal, la perte synaptique et la mort neuronale observée dans la maladie d'Alzheimer.

Toutes ces observations indiquent que le peptide A β pourrait jouer un rôle important dans la neurodégénérescence liée à la MA. Par contre, il serait non-réaliste de considérer la MA comme une maladie unifactorielle. D'ailleurs, plusieurs observations nous montrent que la pathologie A β , à elle seule, ne suffit pas à provoquer la maladie. D'abord, il a été démontré que l'apparition des plaques amyloïdes ne se fait pas toujours selon un motif fixe et que leur propagation corrèle très peu avec le degré de déclin cognitif (Arriagada, Growdon et al. 1992; Nelson, Braak et al. 2009), contrairement à ce qui est observé pour la formation de NFTs (Braak and Braak 1991). Ensuite, plusieurs souris transgéniques ou doubles transgéniques contenant l'APP de type sauvage ou mutée conjuguée à la présence d'autres protéines mutées, telles la PS1, ont été créées et aucune d'entre elles ne développe de NFTs (Chin 2011), caractéristique pathologique de la MA. Finalement, selon la théorie amyloïde, si on réduit la quantité de A β dans le cerveau, on devrait bloquer la progression de la maladie. Dans cette optique, une thérapie basée sur l'immunisation de patients par l'injection de peptides A β a été testée chez des patients atteints de la MA (Holmes, Boche et al. 2008; Small and Duff 2008). Au moment de la thérapie, la majorité des patients n'avaient qu'une atteinte moyenne de MA, telle qu'indiquée par les tests cognitifs. Bien que la thérapie ait significativement diminué le niveau de A β dans le cerveau de ces patients, ces derniers ont eu un profond déclin de leurs facultés cognitives. Lors de l'autopsie, la pathologie de Tau était lourdement disséminée dans le cortex de ces patients alors qu'au moment du traitement, il était estimé que le cortex n'en contenait probablement pas encore. Ces résultats démontrent donc que, bien que l'A β ait un rôle important à jouer dans la neurodégénérescence de la maladie, d'autres phénomènes pathologiques ont aussi une implication majeure dans ce processus dégénératif.

1.1.3.2. Théorie Tau

Tau, dont il sera question en détail dans la section 1.2., est une protéine axonale liée aux microtubules (MTs). Dans la MA, Tau devient anormalement hyperphosphorylée, se

détache des MTs, s'accumule dans le compartiment somato-dendritique et forme des agrégats insolubles (Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986; Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986; Lee, Goedert et al. 2001). Bien que plusieurs mutations dans le gène de Tau sont associées à certains types de démence appelée les démences frontotemporales (Hutton, Lendon et al. 1998), aucune de ces mutations n'est présente dans la MA. C'est d'ailleurs pour cette raison que les chercheurs ont longtemps cru que Tau n'était qu'un épiphénomène provenant du mauvais fonctionnement de l'APP. Par contre, le nombre d'agrégats de Tau présent dans le néocortex corrèle avec la sévérité du déclin cognitif observé dans la MA, ce qui n'est pas observé avec l'apparition des plaques séniles (Arriagada, Growdon et al. 1992). C'est l'une des raisons faisant en sorte que la protéine Tau est de plus en plus étudiée.

1.1.3.2.1. Hyperphosphorylation

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus étudiée de la protéine Tau. On sait, en effet, que Tau contient 85 sites de phosphorylation possibles. De ces 85 sites, seulement 9 ont été observés sous forme phosphorylée dans le cerveau humain adulte normal, alors que 45 sites le sont dans le cerveau de patients souffrant de la MA (Mawal-Dewan, Henley et al. 1994; Hanger, Byers et al. 2007; Hanger, Anderton et al. 2009). Cette phosphorylation de Tau semble se faire selon un ordre précis. En effet, certains sites de phosphorylation tels les sites reconnus par l'anticorps AT8, soit les sérines 199,202 et la thréonine 205 (S199, S202 et T205 respectivement), ainsi que la T231 et la S262, sont phosphorylés très tôt dans la MA. Certains autres sites comme la T217 sont phosphorylés à un stade intermédiaire de la maladie, alors que d'autres, tel l'épitope PHF-1 (S396 et S404), ne sont observés sous forme phosphorylée qu'à un stade avancé de la MA (Kimura, Ono et al. 1996; Augustinack, Schneider et al. 2002; Lauckner, Frey et al. 2003; Maurage, Sergeant et al. 2003; Luna-Munoz, Chavez-Macias et al. 2007). Ces observations ont mené à la théorie de la cascade de phosphorylation de Tau, selon laquelle la phosphorylation de certains sites serait pré-requise à la phosphorylation de sites subséquents. Une étude menée au sein de notre laboratoire a permis d'élucider partiellement cette cascade. Nous avons pu constater que la phosphorylation de certains sites, tel l'épitope de AT8, a un impact sur l'état de phosphorylation d'autres sites en aval de la cascade. Ainsi, nous avons pu observer que la phosphorylation de la S262 favorise la

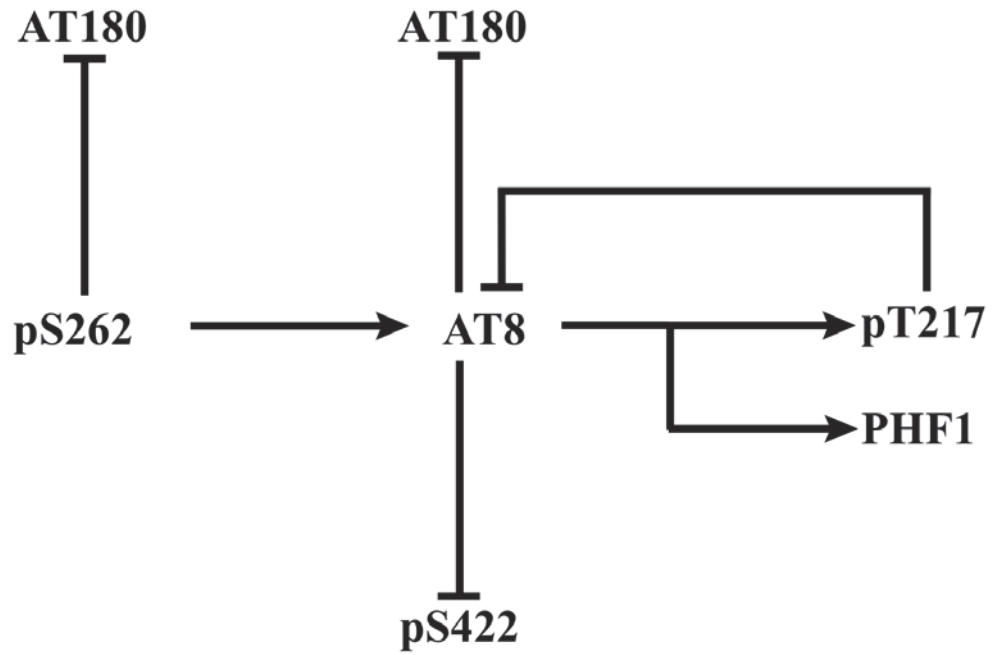
phosphorylation subséquente de l'épitope AT8, ce qui par la suite, augmente la phosphorylation de la T217 et de l'épitope PHF-1. Étonnamment, nous avons aussi démontré que la phosphorylation de certains sites peut diminuer la phosphorylation subséquente d'autres sites. Nous avons ainsi pu établir une cascade de phosphorylation de Tau à partir des sites que nous avons étudiés (Figure 2, p.10). Dans cette cascade, on peut constater que AT8 semble être un point central, pouvant à la fois inhiber et/ou favoriser la phosphorylation à des sites subséquents (Bertrand, Plouffe et al. 2010).

1.1.3.2.2. Relocalisation somato-dendritique de la protéine Tau dans la MA

On sait que la protéine Tau normale se trouve principalement au niveau de l'axone des neurones, alors que dans les cas pathologiques comme la MA, la Tau hyperphosphorylée a une localisation somato-dendritique. Dans une étude récente menée dans notre laboratoire, nous avons surexprimé la protéine Tau humaine dans des neurones hippocampaux de rats et nous avons pu observer que les sites de phosphorylation associés à la pathologie reconnue par les anticorps AT8 (S199/S202/T205), AT100 (T212/S214/T217) et AT180 (T231/S235) sont présents uniquement dans la région somato-dendritique des neurones et non dans l'axone. Par contre, lorsque nous avons inhibé la phosphatase principale de Tau, la phosphatase 2A (PP2A), la phosphorylation aux sites reconnus par les anticorps AT8, AT100 et AT180 est apparue dans l'axone. Ces résultats indiquent donc que la présence de la PP2A dans l'axone empêche normalement la protéine Tau de devenir hyperphosphorylée, mécanisme qui serait absent de la région somato-dendritique. Ces résultats suggèrent donc que la perte d'activité de la PP2A pourrait contribuer à la formation d'épitopes pathologiques dans l'axone et pourrait ainsi être un événement impliqué dans l'initiation de la pathologie de Tau dans la MA (Bertrand, Senechal et al. 2010). En effet, des études ont rapporté qu'il y avait une diminution de l'activité de PP2A dans le cerveau des patients atteints de MA (Gong, Singh et al. 1993; Sontag, Luangpirom et al. 2004).

Figure 2. Cascade de phosphorylation de la protéine Tau.

La phosphorylation de la S262 favorise celle de l'épitope AT8, qui à son tour, favorise la phosphorylation de la T217 et de l'épitope PHF-1. Par la suite, la phosphorylation de la T217 diminue la phosphorylation subséquente à l'épitope AT8 dans une boucle de rétroaction, ce qui permettrait de balancer l'état de phosphorylation de l'épitope AT8 et de T217. De plus, la phosphorylation de l'épitope AT180 est diminuée par la phosphorylation de S262 et/ou de l'épitope AT8. Finalement, la phosphorylation de AT8 diminuerait celle de S422.



Tiré de Bertrand et al., 2010, Neuroscience, 168(2): 323-334

1.1.3.2.3. Agrégation de la protéine Tau

Les NFTs sont l'une des deux caractéristiques principales de la MA. Dans la pathologie, les NFTs apparaissent toujours dans une partie bien précise du cerveau pour ensuite se propager à différentes régions d'une manière prévisible. Les NFTs apparaissent, en effet, toujours dans le cortex trans-entorhinal pour ensuite se propager là où celui-ci projette, soit au cortex entorhinal. Les NFTs se propagent ultérieurement à l'hippocampe, puis aux différentes régions du cortex et néocortex (Lace, Savva et al. 2009; Brundin, Melki et al. 2010). Pour qu'il y ait formation de NFTs, il doit d'abord y avoir accumulation de Tau hyperphosphorylée dans le compartiment somato-dendritique (Lee, Goedert et al. 2001). Cette population va ensuite former des dépôts filamenteux insolubles qui ont le plus souvent l'aspect de paires de filaments hélicoïdaux (PHFs) ou de filaments droits (Kidd 1963; Spillantini and Goedert 1998). Ces filaments vont ensuite s'agréger pour former les NFTs (Braak, Braak et al. 1994). De plus, il existe certains facteurs capables d'induire ou de faciliter l'agrégation de Tau. On sait ainsi que les sulfoglycosaminoglycans peuvent faciliter la polymérisation de Tau *in vitro* et qu'ils sont présents dans les NFTs (Goedert, Jakes et al. 1996; Perez, Valpuesta et al. 1996). Il a de plus été démontré que les acides gras comme l'acide arachidonique peuvent induire la polymérisation de Tau *in vitro* (Wilson and Binder 1997).

1.1.3.2.4. Pathologie de Tau

Comme mentionné précédemment, la présence des NFTs corrèle avec le déclin cognitif chez les personnes atteintes de la MA (Arriagada, Growdon et al. 1992). En effet, il existe une corrélation inverse entre le nombre de NFTs extracellulaires et le nombre de neurones vivants, suggérant de ce fait que les neurones développant les NFTs pourraient dégénérer et libérer ceux-ci dans le milieu extracellulaire (Goedert 1999). Des modèles de souris transgéniques surexprimant la protéine Tau humaine ont de plus corroboré l'apparition de problèmes cognitifs et de pertes neuronales avec l'apparition des NFTs (Ishihara, Hong et al. 1999; Lewis, McGowan et al. 2000; Gotz, Chen et al. 2001; Tatebayashi, Miyasaka et al. 2002; Andorfer, Kress et al. 2003). Toutes ces associations entre neurodégénérescence et présence d'agrégats de Tau ont mené à la conclusion que les NFTs étaient la cause des dysfonctions neuronales apparaissant dans le cerveau atteint de la

MA. D'ailleurs, chez des souris transgéniques surexprimant la protéine Tau humaine contenant la mutation P301L, il a été démontré que l'accumulation des filaments de Tau dans le corps cellulaire des neurones pouvait déplacer plusieurs organelles cytoplasmiques de leur localisation habituelle et aussi diminuer le nombre usuel d'organelles (Lin, Lewis et al. 2003). De plus, les PHFs, qu'ils soient isolés de cerveau de patients Alzheimer ou produits *in vitro*, ont la capacité d'inhiber l'activité du protéasome (Keck, Nitsch et al. 2003). Cette perte pourrait contribuer à la perturbation de l'homéostasie de la cellule.

Par contre, les neurones CA1 hippocampaux sont capables de survivre environ 20 ans en la présence de NFTs cytosoliques (Gendron and Petrucelli 2009), donnée qui semble remettre en question la toxicité *per se* des agrégats. De surcroît, l'étude de SantaCruz et al. (2005) a permis de démontrer que la présence de NFTs n'était pas suffisante pour induire la mort cellulaire et les déclin cognitifs dans leur modèle de souris transgénique surexprimant la protéine Tau humaine mutante P301L dont l'expression peut être régulée. Ils ont en effet découvert que lorsqu'ils supprimaient l'expression de la protéine Tau humaine chez ces souris à l'âge de 2.5 mois, âge à laquelle ces souris présentent des NFTs, la mémoire était recouvrée et la perte neuronale stabilisée bien que l'accumulation de NFTs n'était pas interrompue (Santacruz, Lewis et al. 2005). Ces résultats ont donc suggéré que la présence de NFTs n'était pas suffisante pour induire la pathologie. Ces données remettent donc en question la toxicité des agrégats de Tau, phénomène n'ayant d'ailleurs jamais été prouvé de façon directe. L'hypothèse émergente est donc que la formation des NFTs résulterait d'un mécanisme de protection mis en place par la cellule afin de se protéger de la toxicité de la protéine Tau hyperphosphorylée libre.

En effet, plusieurs observations semblent indiquer que la Tau hyperphosphorylée pourrait elle-même être très toxique pour les neurones. Tout d'abord, Tau est reconnue pour son rôle de liaison aux MTs. Par contre, la phosphorylation de Tau diminue son affinité pour les MTs, compromettant ainsi son efficacité à promouvoir la polymérisation et l'assemblage de ces derniers (Lindwall and Cole 1984; Drechsel, Hyman et al. 1992), ce qui entraînerait l'effondrement du réseau microtubulaire (Ebner, Drewes et al. 1999). Également, plusieurs modèles de tauopathies humaines ont été développés chez la drosophile. Ces modèles présentent plusieurs caractéristiques pathologiques présentes dans les tauopathies, soit l'accumulation de Tau hyperphosphorylée au sein des neurones corrélant avec la dégénérescence neuronale. Par contre, cette dégénérescence induite par

Tau se fait en l'absence de NFTs, démontrant que la protéine Tau hyperphosphorylée cytosolique est en elle-même suffisante pour induire la toxicité (Wittmann, Wszolek et al. 2001; Steinhilb, Dias-Santagata et al. 2007; Feuillette, Miguel et al. 2010). De plus, il a été démontré dans différentes lignées cellulaires de souris transgéniques surexprimant la protéine Tau humaine que cette dernière peut provoquer la mort cellulaire en l'absence de filament (Spittaels, Van den Haute et al. 1999; Probst, Gotz et al. 2000). Qui plus est, dans un modèle de souris transgéniques surexprimant la GSK-3 β , une enzyme phosphorylant la protéine Tau, il est possible d'observer l'hyperphosphorylation de Tau, sa relocalisation somato-dendritique ainsi que la mort neuronale en l'absence de filaments de Tau (Hernandez, Borrell et al. 2002). Les raisons de cette toxicité pourraient provenir du fait que la protéine Tau cytosolique hyperphosphorylée peut séquestrer les protéines associées aux MTs et ainsi perturber le réseau de MTs (Iqbal, Alonso Adel et al. 2008). De plus, il a été postulé qu'une quantité de Tau liée aux MTs de façon excessive pourrait provoquer l'inhibition du transport de vésicules, d'organelles et d'éléments du cytosquelette ce qui pourrait grandement nuire à la survie cellulaire et compromettre l'intégrité des synapses (Stamer, Vogel et al. 2002; Mandelkow, Stamer et al. 2003). Également, il a été observé que la pseudohyperphosphorylation de Tau peut promouvoir sa toxicité par activation de voies apoptotiques dans les cellules différenciées PC12 (Fath, Eidenmuller et al. 2002).

La toxicité de la protéine Tau intracellulaire ne fait aucun doute. Par contre, il existe une population de Tau extracellulaire, phénomène dont il sera question à la section 1.2.5.3. Hors, il a été démontré que la protéine Tau extracellulaire pouvait être toxique pour les neurones, celle-ci pouvant agir par les récepteurs membranaires muscariniques (Gomez-Ramos, Diaz-Hernandez et al. 2006; Gomez-Ramos, Diaz-Hernandez et al. 2008). Il est d'ailleurs observé que la protéine Tau extracellulaire hypophosphorylée était davantage toxique que les NFTs de Tau se trouvant à l'extérieur des cellules. Au final, toutes ces observations démontrent que la présence de la pathologie de Tau pourrait participer au processus de neurodégénérescence observé dans la MA.

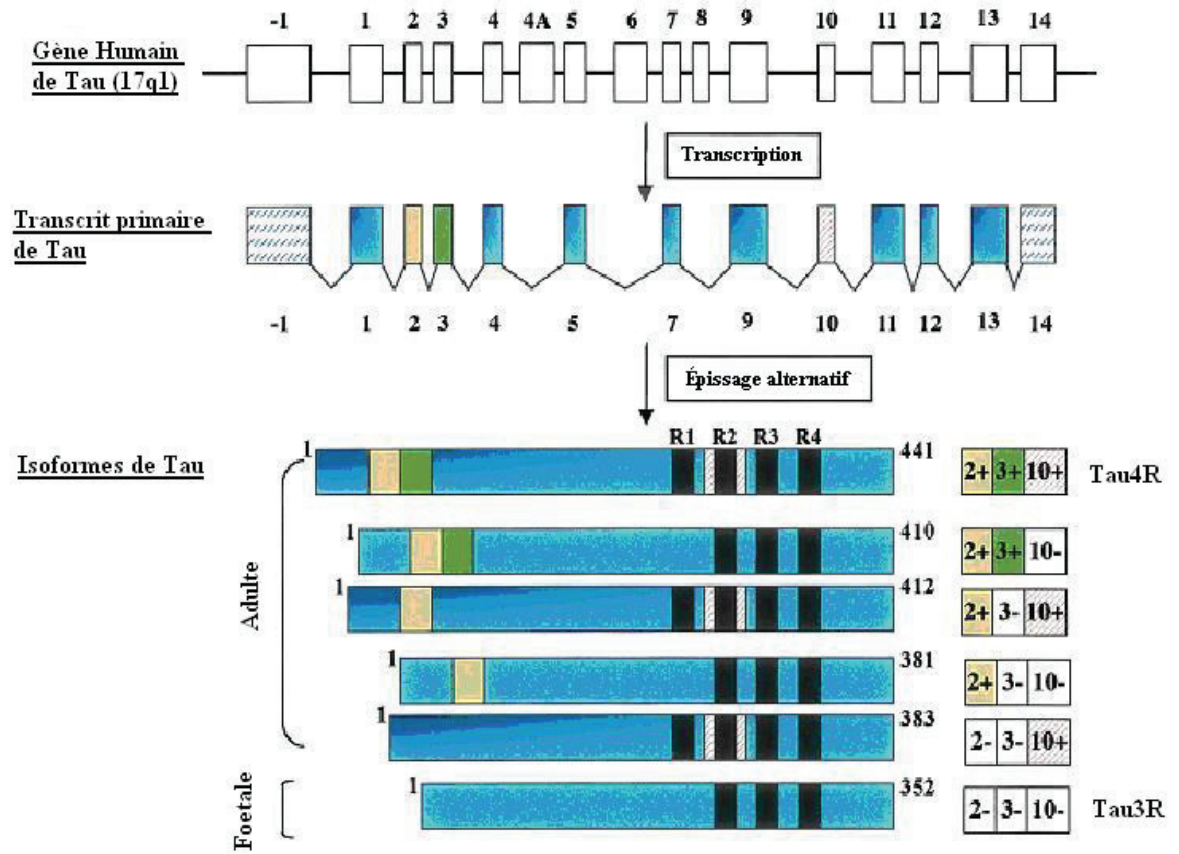
1.2. La protéine Tau

1.2.1. Structure

Tau fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules, les MAPs. Le gène codant pour Tau se trouve sur le bras long du chromosome 17, à la position 17q21 (Neve, Harris et al. 1986). La protéine Tau contient à la base 16 exons et peut former au total 6 isoformes grâce à l'épissage alternatif (Figure 3, p.16) (Andreadis, Brown et al. 1992; Couchie, Mavilia et al. 1992; Goedert, Spillantini et al. 1992; Sawa, Oyama et al. 1994; Nelson, Stefansson et al. 1996; Buee, Bussiere et al. 2000). La portion C-terminale contenant les exons 9 à 12 est caractérisée par la présence de 3 ou 4 répétitions très conservées de 18 acides aminés, d'où l'appellation Tau3R et Tau4R respectivement (Goedert, Spillantini et al. 1989; Buee, Bussiere et al. 2000). La portion N-terminale tant qu'à elle est caractérisée par l'absence ou la présence de 1 ou 2 inserts, codés par les exons 2 et 3, d'où l'appellation 0N, 1N ou 2N (Goedert, Spillantini et al. 1989; Himmler, Drechsel et al. 1989). Cette région de la protéine est très acide et est suivie d'une région riche en proline plutôt basique (Buee, Bussiere et al. 2000). La partie N-terminale et la région riche en proline forment le domaine de projection de la protéine, car il fait sailli à la surface des MTs (Hirokawa, Shiomura et al. 1988), alors que la portion contenant les répétitions R1 à R4 forme le domaine de liaison aux MTs (Figure 4, p.18). La protéine Tau présente une structure allongée en forme de bâtonnet et une propriété hydrophile (Hirokawa, Shiomura et al. 1988). Les six isoformes de Tau, variant entre 352 à 441 acides aminés, sont exprimées dans le cerveau adulte, alors que seulement la Tau3R0N est exprimée dans le cerveau fœtal (Goedert, Spillantini et al. 1989; Kosik, Orecchio et al. 1989). L'exon 4A est tant qu'à lui spécifique au système nerveux périphérique.

Figure 3. Schéma des différentes isoformes de la protéine Tau humaine du système nerveux central générées par épissage alternatif.

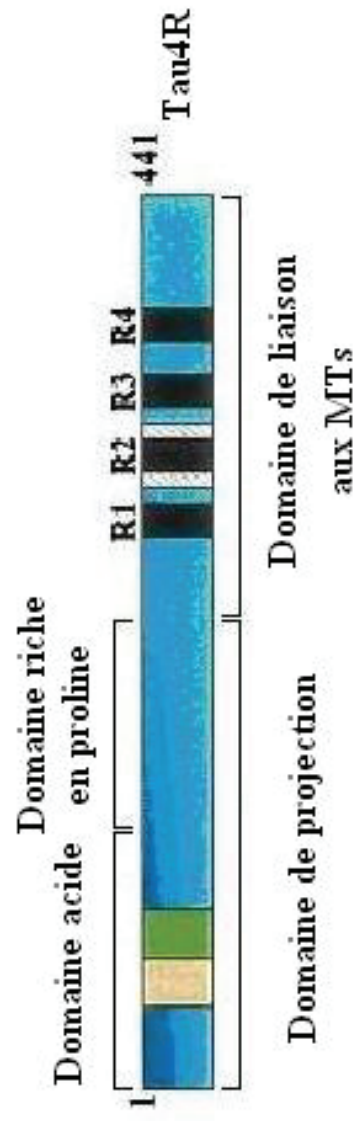
Le gène de la protéine Tau humaine se trouve sur le chromosome 17, à la position 17q21. Il contient au total 16 exons, bien que le transcrit primaire n'en contienne que 13 dû à l'absence de transcription des exons 4A, 6 et 8 dans le cerveau humain. Les exons -1 et 14 sont transcrits mais non traduits et les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13 sont constitutifs. Les 6 isoformes de Tau sont obtenues suite à l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10. Ces isoformes se différencient donc par la présence de 3 ou 4 séquences répétées dans la région carboxy-terminale (exons 9 à 12) ainsi que par l'absence ou la présence de 1 ou 2 inserts de 29 acides aminés (exons 2 et 3) dans la région amino-terminale. Les six isoformes de Tau, comportant 352, 381, 383, 410, 412, 441 acides aminés chacune, se retrouvent chez l'adulte alors que seulement la plus courte est présente dans le cerveau fœtal.



Modifié de Buée L. et al., 2000, *Brain Res. Rev.* 33 :95-130.

Figure 4. Schéma de la plus longue isoforme de Tau et de ses domaines.

La portion C-terminale de la protéine Tau forme le domaine de liaison aux MTs et contient les séquences répétitives R1 à R4. La région N-terminale, tant qu'à elle, forme le domaine de projection et regroupe les exons 2 et 3, formant la région acide, suivie d'une région riche en proline basique. L'isoforme de Tau de 441 acides aminés de cette figure est utilisée à titre d'exemple, la nomenclature s'appliquant à toutes les isoformes de Tau.



Modifié de Buée L. et al., 2000, *Brain Res. Rev.* 33 :95-130

1.2.2. Localisation

La protéine Tau est principalement retrouvée dans les axones neuronaux, et ce pour les six isoformes de la protéine (Binder, Frankfurter et al. 1985; Brion, Guilleminot et al. 1988). Tau peut être synthétisée dans le corps cellulaire, là où se trouve la majeure partie des organelles de traduction et ensuite transportée le long de l'axone grâce à la kinésine (Utton, Noble et al. 2005). De plus, il a été démontré que la protéine Tau pouvait être synthétisée directement dans l'axone grâce à la présence d'un signal de ciblage axonal situé dans la région 3' non traduite de son ARNm (Litman, Barg et al. 1993; Litman, Barg et al. 1994; Aronov, Aranda et al. 2001; Aronov, Aranda et al. 2002; Giuditta, Chun et al. 2008). Grâce à son association avec des protéines de liaison à l'ARN, ce dernier se retrouve dans l'axone où la protéine Tau peut être synthétisée. La localisation principalement axonale de Tau pourrait être expliquée par une stabilisation de cette dernière grâce à sa forte affinité aux MTs axonaux (Hirokawa, Funakoshi et al. 1996). Également, bien que Tau soit très concentrée au niveau de l'axone, il a été démontré que les six isoformes de Tau se retrouvent aussi dans le noyau cellulaire (Brady, Zinkowski et al. 1995). Finalement, la protéine Tau est aussi présente dans le compartiment somato-dendritique des neurones, où elle peut s'associer aux MTs, ribosomes, polysomes (Papasozomenos and Binder 1987) et à Fyn, une tyrosine kinase de la famille des src (Lee, Newman et al. 1998).

1.2.3. Fonctions

1.2.3.1. Liaison au cytosquelette

La protéine Tau joue un rôle important dans l'initiation de l'assemblage ainsi que l'élongation des MTs à partir de la tubuline purifiée (Witman, Cleveland et al. 1976; Brandt and Lee 1993; Al-Bassam, Ozer et al. 2002; Kar, Fan et al. 2003). Ainsi, *in vitro* Tau peut interagir avec la tubuline et induire sa polymérisation (Weingarten, Lockwood et al. 1975; Cleveland, Hwo et al. 1977; Serrano, Montejo de Garcini et al. 1985). De plus, il a été démontré *in vivo* que lorsqu'on exprime la protéine Tau dans un modèle n'en contenant pas de façon endogène, comme les fibroblastes, elle va s'associer spécifiquement aux MTs. Cette association permet la polymérisation de la tubuline ainsi que la stabilisation des MTs contre la dépolymérisation (Drubin and Kirschner 1986). Pour ce faire, la partie de liaison

aux MTs de Tau se lie à la région C-terminale acide de la tubuline (Serrano, Montejo de Garcini et al. 1985). D'ailleurs, il a été démontré que la Tau4R a une plus grande affinité pour les MTs dû à une région se trouvant entre les répétitions 1 et 2 n'étant pas présente chez la Tau3R (Goode and Feinstein 1994). La région riche en proline du domaine de projection de Tau aussi aide à l'interaction avec les MTs en renforçant leur liaison et en augmentant leur assemblage par le biais d'interactions intramoléculaires entre cette région et le domaine de liaison aux MTs (Goode, Denis et al. 1997). Le domaine de projection de la protéine Tau sert également à déterminer l'espacement entre les MTs axonaux (Chen, Kanai et al. 1992; Leclerc, Baas et al. 1996) et sert à la liaison des MTs adjacents ensemble, ce qui permet leur stabilisation (Hirokawa, Shiomura et al. 1988). Il a aussi été démontré que Tau peut lier les filaments d'actine (Correas, Padilla et al. 1990; Henriquez, Cross et al. 1995) et les neurofilaments (Letierrier, Liem et al. 1982; Aamodt and Williams 1984; Heimann, Shelanski et al. 1985), permettant ainsi l'interconnexion des MTs avec d'autres composants du cytosquelette, pouvant ainsi diminuer la flexibilité de ce dernier (Matus 1994).

De par sa fonction de liaison aux MTs, Tau joue un rôle essentiel dans l'établissement de la polarité neuronale. Cela a été démontré en inhibant l'expression de la protéine Tau grâce à des oligonucléotides antisens, ce qui a entraîné des défauts dans la formation des neurites (Caceres and Kosik 1990; Caceres, Potrebic et al. 1991; Kempf, Clement et al. 1996). De plus, l'expression de Tau dans des cellules d'insectes (sf9) induit la formation de longues extensions cytoplasmiques, démontrant le rôle de Tau dans la formation et le maintien des neurites (Knops, Kosik et al. 1991). Le rôle de Tau dans la pousse neuritique a aussi été mis en évidence dans les cultures de neurones préparées à partir des souris où le gène de Tau est inactivé (Tau-KO). Deux modèles de souris déficientes pour Tau ont été développés. Dans le premier, il n'y a globalement aucun changement au niveau des MTs, sauf au niveau du cervelet où l'on observe une diminution de la stabilité des MTs ainsi qu'une modification de leur organisation dans les axones de petits calibres (Harada, Oguchi et al. 1994). Ces derniers présentent une diminution de densité microtubulaire ainsi qu'une moins grande fréquence des ponts entre MTs. Malgré ces problèmes, les souris ne présentent pas d'anomalies apparentes dans l'élongation axonale et la polarisation neuronale. Ce phénomène pourrait être provoqué par une augmentation de la MAP1A chez ces souris, protéine possédant une redondance

fonctionnelle avec Tau au niveau de la croissance axonale (DiTella, Feiguin et al. 1996; Takei, Teng et al. 2000). Ces souris Tau-KO développent tout de même une faiblesse musculaire ainsi que certaines altérations comportementales à un âge avancé, suggérant une certaine atteinte neurologique imputable à l'absence de Tau (Harada, Oguchi et al. 1994; Ikegami, Harada et al. 2000). Dans le deuxième modèle de souris déficiente pour Tau et contrairement à ce qui avait été observé avec le premier, les neurones mis en culture présentaient un délai significatif dans la maturation neuronale, mesuré par le délai de l'élongation axonale et neuritique, bien que les souris elles-mêmes soient viables (Dawson, Ferreira et al. 2001). De plus, une étude effectuée avec cette lignée de souris révèle que la compensation de la perte de Tau se ferait via une augmentation de la MAP2C (Rapoport, Dawson et al. 2002).

1.2.3.2. Liaison aux membranes

La protéine Tau a la capacité de se lier à la membrane plasmique des cellules et peut ainsi faire le lien entre cette dernière et les MTs (Brandt, Leger et al. 1995). En effet, la région riche en proline de Tau a la capacité de se lier au domaine SH3 des tyrosines kinases de la membrane plasmique tel que Fyn. De plus, le complexe Tau-Fyn peut s'associer à l'actine et moduler son organisation, ce qui pourrait conduire à la modification de la morphologie de la cellule (Lee, Newman et al. 1998). En plus de sa capacité de liaison directe à l'actine, Tau peut se lier de manière indirecte à celle-ci via son association à la spectrine, ce qui permet la modulation de l'intégrité de la membrane plasmique et du cytosquelette d'actine (Carlier, Simon et al. 1984). Finalement, Tau peut interagir avec diverses organelles cytoplasmiques. En effet, la protéine Tau régule l'attachement de l'appareil de Golgi sur les MTs (Farah, Perreault et al. 2006) et sa surexpression entraîne une fragmentation de cette organelle (Liazoghli, Perreault et al. 2005). De plus, chez des souris surexprimant une forme mutante de la protéine Tau humaine hyperphosphorylée, on observe une augmentation de l'interaction de Tau avec le réticulum endoplasmique ainsi que du contact de celui-ci avec les mitochondries (Perreault, Bousquet et al. 2009). Finalement, la protéine Tau a été retrouvée à la surface des mitochondries, permettant ainsi la liaison de celles-ci avec les MTs (Rendon, Jung et al. 1990).

En plus de toutes ces liaisons, Tau pourrait jouer un rôle dans le transport axonal, bien que cette hypothèse soit plutôt controversée. Il y a en effet plusieurs modèles cellulaires, neuronaux et non-neuronaux qui ont démontré qu'une surexpression de la protéine Tau inhibe le transport kinésine-dépendant de plusieurs types d'organelles, comme par exemple, les endosomes (Ebner, Godemann et al. 1998; Stamer, Vogel et al. 2002; Dubey, Chaudhury et al. 2008). D'autres études *in vitro* ont corroborés ces résultats (Seitz, Kojima et al. 2002; Vershinin, Carter et al. 2007) et ont permis de démontrer que la surexpression de Tau inhibe également le transport dynéine-dépendant (Dixit, Ross et al. 2008). L'étude du Dr Magnani et de son groupe a d'ailleurs démontré que Tau interagit avec la dynactine (Magnani, Fan et al. 2007), une protéine essentielle à l'activité de la dynéine (Schroer 2004). Par contre, plusieurs autres études ont observé que la surexpression de Tau n'affecte pas directement la motilité des moteurs kinésine et dynéine (Morfini, Pigino et al. 2007; Yuan, Kumar et al. 2008). Il a finalement été démontré que la présence des filaments insolubles de Tau dans les neurones provoque la perturbation du transport axonal (LaPointe, Morfini et al. 2009).

1.2.3.3. Signalisation

Tau joue également un rôle dans plusieurs voies de signalisation cellulaire. La région riche en proline de cette protéine peut interagir avec la phospholipase C- γ , une enzyme centrale dans plusieurs voies de signalisation (Noh, Shin et al. 1995; Hwang, Jhon et al. 1996; Jenkins and Johnson 1998). De plus, Tau peut interagir avec la sous-unité p85 α de la PI(3)-kinase, une enzyme impliquée dans la survie, la croissance, la prolifération et la motilité cellulaire (Reynolds, Garwood et al. 2008). Cette dernière étude a de plus démontré l'interaction entre Tau et diverses molécules impliquées dans des voies de signalisation, interactions modulées par l'état de phosphorylation de Tau. D'autre part, lorsque Tau subit sa relocalisation somato-dendritique massive dans la pathologie, elle peut entraîner avec elle une grande quantité de la kinase Fyn au niveau des dendrites, ce qui peut mener à l'effet d'excitotoxicité provoqué par l'interaction de cette dernière avec les récepteurs NMDA (Ittner, Ke et al. 2010). Finalement, Tau est requise au processus d'initiation de la pousse des neurites, et ce indépendamment de sa fonction de liaison aux MTs. Tau peut en effet potentialiser l'activation de MAPK («mitogen-activated protein kinase») en réponse

au NGF («*nerve growth factor*») dans les cellules PC12, ce qui a pour effet d'augmenter l'activation du facteur de transcription AP-1 («*activator protein 1*»), phénomène nécessaire à l'initiation de la pousse des neurites (Leugers and Lee 2010).

1.2.3.4. Liaison à l'ADN

Tau a été abondamment étudiée pour sa liaison aux MTs. Par contre, une étude publiée en 1980 a révélé que la protéine Tau a une plus grande affinité pour l'ADN que pour les MTs (Corces, Manso et al. 1980). De plus, Tau a été observée dans le noyau de plusieurs types de cellules, dont celles du neuroblastome humain, du carcinome cervical humain, des macrophages humaines, des cellules rénales de singe et chez la lignée cellulaire PC12 (Loomis, Howard et al. 1990; Wang, Loomis et al. 1993; Brady, Zinkowski et al. 1995; Thurston, Zinkowski et al. 1996; Cross, Munoz et al. 2000). Une étude récente a révélé que Tau se lie au sillon mineur de l'ADN double brin via le domaine riche en proline et le domaine de liaison aux MTs simultanément. Grâce à cette association, Tau peut protéger l'ADN double brin de la dénaturation face à la chaleur et contre les attaques des radicaux libres hydroxyl (Wei, Qu et al. 2008).

1.2.4. Phosphorylation de Tau

1.2.4.1. Rôle physiologique

La phosphorylation de Tau est une des ses principales modifications post-traductionnelles. L'isoforme la plus longue de Tau dans le système nerveux central (441 acides aminés) contient 85 sites potentiellement phosphorylables (Avila, Lucas et al. 2004). Cette phosphorylation a un rôle important à jouer notamment au niveau du développement. En effet, la protéine Tau du système nerveux central embryonnaire a un niveau de phosphorylation beaucoup plus élevé que l'adulte, l'état de phosphorylation des 6 isoformes de Tau diminuant graduellement avec l'âge (Kanemaru, Takio et al. 1992; Watanabe, Hasegawa et al. 1993). Ce phénomène peut être attribuable à l'activation de phosphatases telles que PP2A et PP2B (Mawal-Dewan, Henley et al. 1994). On sait, par exemple, que dans le système nerveux central du poulet (Pope, Enam et al. 1993) et dans les cellules sf9, la phosphorylation de Tau est associée aux premiers stades du

développement axonal. En effet, la phosphorylation de Tau aux sérines 262 et 356 est requise pour le développement des prolongements neuronaux (Biernat and Mandelkew 1999). De plus, la phosphorylation de Tau, que ce soit de façon générale ou spécifiquement à un ou des sites, agit sur l'association de Tau et des différents composés avec lesquels elle interagit, soit en diminuant ou même en inhibant leurs interactions. À cause de l'importance de cette modification post-traductionnelle, il existe sur le marché plusieurs anticorps phosphodépendants dirigés contre des sites précis de phosphorylation de Tau, ce qui facilite l'étude de ce phénomène.

1.2.4.2. Sites de phosphorylation

La protéine Tau contient 85 sites de phosphorylation. Dans la MA, plus d'une quarantaine de sites sont phosphorylés. Plusieurs kinases peuvent phosphoryler Tau *in vivo* et *in vitro*. Tau peut être phosphorylée sur des sérines (Ser), thréonines (Thr) et Tyrosines (Tyr) (Avila, Lucas et al. 2004). La majorité de ces sites sont suivis d'une proline (Pro) et sont généralement phosphorylés par des kinases appelées PDPK («*proline-directed protein kinases*») dirigées contre les motifs Ser-Pro et Thr-Pro de Tau (Buee, Bussiere et al. 2000). Les kinases dites non-PDPK tant qu'à elles vont phosphoryler les sites non suivis d'une proline (Morishima-Kawashima, Hasegawa et al. 1995).

1.2.4.3. Pathologies d'hyperphosphorylation

Les tauopathies, dont il sera question plus loin, se caractérisent par la formation de NFTs composés de PHFs de Tau. Il a été démontré qu'il doit y avoir une accumulation de Tau hyperphosphorylée pour voir apparaître les NFTs (Bancher, Brunner et al. 1989; Braak, Braak et al. 1994). On sait d'ailleurs que l'hyperphosphorylation de Tau entraîne plusieurs changements au niveau de sa conformation et de sa fonction, son hyperphosphorylation amenant le repliement de la protéine sur elle-même (Jeganathan, Hascher et al. 2008), ce qui entraîne la formation des agrégats (Abraha, Ghoshal et al. 2000; Alonso, Zaidi et al. 2001; Sato, Tatebayashi et al. 2002; Haase, Stieler et al. 2004). On sait, par exemple, que la phosphorylation de Tau en C-terminal, aux sérines 396 et 422, cause une augmentation de son agrégation (Abraha, Ghoshal et al. 2000; Haase, Stieler et

al. 2004). Toutes ces observations laissent supposer que la phosphorylation anormale de Tau pourrait être un événement clé dans la formation des PHFs et, par conséquent, dans l'apparition des tauopathies.

En plus d'avoir la capacité d'induire la formation d'agrégats, la phosphorylation de Tau peut lui conférer une résistance au clivage. Par exemple, la phosphorylation de Tau en C-terminal augmente sa résistance au clivage par les protéases calpines, entraînant de ce fait une diminution de dégradation et son accumulation dans la cellule (Johnson 1992; Litersky and Johnson 1992; Litersky and Johnson 1995). De plus, une étude a démontré que la phosphorylation de Tau à la sérine 422 la protège contre le clivage par la caspase-3 (Guillozet-Bongaarts, Cahill et al. 2006).

Tau est reconnue pour son rôle de liaison aux MTs. Par contre, des études ont démontré que la phosphorylation de Tau diminue son affinité pour les MTs, compromettant ainsi son efficacité à promouvoir la polymérisation et l'assemblage de ces derniers (Lindwall and Cole 1984; Drechsel, Hyman et al. 1992), ce qui entraînerait l'effondrement du réseau microtubulaire (Ebner, Drewes et al. 1999). On sait, entre autre, que la phosphorylation de la protéine à S396, T231 et S262 réduit sa liaison aux MTs (Biernat, Gustke et al. 1993; Bramblett, Goedert et al. 1993; Sengupta, Kabat et al. 1998). Par contre, une étude menée par le Dr Planel et son équipe a démontré *in vitro* et *in vivo* que l'hyperphosphorylation de Tau n'affecte pas la stabilité des MTs et qu'il n'y a, par conséquent, pas d'effondrement du réseau microtubulaire (Planel, Krishnamurthy et al. 2008).

Finalement, on sait que la liaison de Tau à la membrane plasmique dépend de la déphosphorylation de certains sites se trouvant dans la région riche en proline de la protéine (Arrasate, Perez et al. 2000). De plus, une étude faite avec un mutant de Tau mimant l'hyperphosphorylation vue dans les PHFs a démontré une abolition complète de la liaison Tau mutée et membrane plasmique (Maas, Eidenmuller et al. 2000). En bref, la phosphorylation de la protéine Tau semble avoir une incidence sur plusieurs, sinon toutes ses fonctions.

1.2.5. Tauopathies

Les tauopathies se caractérisent par la présence de NFTs. On en retrouve plusieurs types, telles la dégénérescence cortico-basale, la paralysie supra-nucléaire progressive, la démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (FTDP-17), etc. (Buee, Bussiere et al. 2000; Lee, Goedert et al. 2001). La plus connue des tauopathies est sans aucun doute la MA. Ces maladies ont comme point commun la présence d'une accumulation intracellulaire de dépôts filamenteux insolubles de Tau hyperphosphorylée (Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986; Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986; Goedert, Wischik et al. 1988; Kosik, Orecchio et al. 1988; Wischik, Novak et al. 1988; Lee, Balin et al. 1991), sous forme de PHFs ou de filaments droits (Kidd 1963; Spillantini and Goedert 1998). Ces filaments forment ensuite les NFTs qui s'accumulent dans le compartiment somato-dendritique (Kowall and Kosik 1987; Braak, Braak et al. 1994). Ce processus est appelé la dégénérescence neurofibrillaire.

Par contre, les tauopathies se distinguent les unes des autres notamment par les isoformes de Tau impliquées dans la formation des filaments. Ainsi, les six isoformes de la protéine sont impliquées dans la MA (Goedert, Spillantini et al. 1992). Par contre, dans la maladie de Pick et la dégénérescence corticobasale, ce sont uniquement les isoformes 3R et 4R respectivement qui sont impliqués (Friedhoff, von Bergen et al. 2000; Lee, Goedert et al. 2001). Une autre caractéristique permettant la différenciation des tauopathies est la présence de lésions pathologiques autres que celle de Tau. On peut prendre l'exemple de la MA qui présente, en plus des NFTs de Tau, des dépôts extracellulaires d'amyloïde β (Buee, Bussiere et al. 2000) comme précédemment discutés.

1.2.5.1. Les mutations de Tau

Pendant longtemps, la pathologie de la protéine Tau a été considérée comme un épiphénomène de la MA puisque cette protéine ne comportait aucune mutation connue (Hardy and Selkoe 2002). C'est en 1998 qu'il a clairement été démontré que des anomalies de la protéine Tau étaient suffisantes pour causer une maladie puisque plusieurs mutations dans le gène de Tau avaient été découvertes chez des patients atteints de FTDP-17 (Clark, Poorkaj et al. 1998; Hong, Zhukareva et al. 1998; Hutton, Lendon et al. 1998; Poorkaj, Bird et al. 1998; Spillantini and Goedert 1998). Depuis ce jour, plus d'une trentaine de mutations

de Tau ont été identifiées que l'on regroupe en quatre types différents: les mutations faux-sens, introniques, silencieuses et de délétion (Goedert 2004). Les mutations faux-sens sont les plus communes et provoquent la substitution d'un acide aminé par un autre dans les exons 9 à 13. Les mutations introniques, tant qu'à elles, sont présentes après l'intron 9, mais surtout dans l'intron 10 où on retrouve aussi les mutations silencieuses qui ne changent pas l'acide aminé codé. Finalement, une seule mutation de délétion est présente dans l'exon 10 et provoque la suppression d'un acide aminé. Ces mutations ont deux conséquences fonctionnelles possibles, soit au niveau de la protéine, à cause d'un changement dans la séquence peptidique, et l'autre où l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager est altéré, ce qui cause une augmentation des isoformes 4R (Buee, Bussiere et al. 2000; Lee, Goedert et al. 2001; Goedert 2004).

Bien que plusieurs mutations de Tau aient été observées, il est important de souligner que les cas familiaux de tauopathies, c'est-à-dire dépendant de la génétique et des mutations, sont rares. La grande majorité des cas sont sporadiques, indiquant alors que les mutations dans le gène de Tau ne sont pas les principaux coupables pour toutes ces maladies. Il semblerait, par contre, que les polymorphismes observés dans le gène de Tau peuvent constituer un des mécanismes important à l'origine de certaines tauopathies sporadiques (Schraen-Maschke, Dhaenens et al. 2004).

1.2.5.2. Les modèles animaux

La capacité de Tau à induire la pathologie a été reconfirmée grâce aux animaux transgéniques (Gotz and Ittner 2008). En effet, il est possible de reproduire le processus d'agrégation de Tau *in vivo* dans des souris transgéniques. En fait, toutes les souris exprimant une forme mutante de Tau et certaines exprimant des formes normales de la protéine Tau humaine développent des filaments insolubles de Tau hyperphosphorylée. De plus, les régions atteintes chez ces souris corrént avec celles affectées dans les tauopathies humaines correspondantes. Il existe également des souris doubles et triples transgéniques qui, en plus d'exprimer une forme mutante de Tau, expriment d'autres protéines humaines impliquées dans les tauopathies (p25, APP mutante, α -synucléine mutante, PS1 mutante). Ces souris développent les caractéristiques typiques des maladies qu'elles représentent, dont

l'apparition de filaments insolubles de Tau hyperphosphorylée et la neurodégénérescence qui s'en suit.

1.2.5.3. Liquide cérébro-spinal

Depuis quelques années, les chercheurs ont commencé à examiner le liquide cérébro-spinal (LCS) de patients atteints de la MA afin de trouver des biomarqueurs permettant un diagnostic plus précis et précoce de la maladie. Comme les plaques amyloïdes se retrouvent à l'extérieur de la cellule, il n'est pas surprenant d'en retrouver dans le LCS. En revanche, chez les patients atteints de la MA, le niveau du peptide A β est plus bas que chez les personnes non-atteintes de démence, probablement dû au fait de l'agrégation du peptide A β en plaque, ce qui diminue la quantité pouvant diffuser dans le LCS (Andreasen, Hesse et al. 1999; Blennow, de Leon et al. 2006). D'autre part, il a été découvert que la protéine Tau, bien que cytosolique, se trouve également dans le LCS (Arai, Terajima et al. 1995; Kahle, Jakowec et al. 2000; Andreasen, Minthon et al. 2001; Hampel, Buerger et al. 2001; Mattsson, Zetterberg et al. 2009). Cette Tau extracellulaire est généralement clivée. En effet, une étude a détecté la protéine Tau pleine longueur ainsi que des fragments de cette Tau clivée dans leur portion C-terminale (Borroni, Gardoni et al. 2009). D'autre part, une autre étude menée sur la protéine Tau présente dans le LCS n'a détecté que de la protéine Tau clivée, contenant dans la majorité des cas une portion N-terminale intacte (Johnson, Seubert et al. 1997). Les chercheurs ont longtemps cru que cette Tau extracellulaire provenait de la vague de mort neuronale observée dans la MA. Par contre, on sait maintenant que même les personnes âgées non-atteintes de la MA, présentent de la Tau dans le LCS (Hampel and Blennow 2004). De plus, l'étude de Barten et al. (2011) réalisée sur trois modèles de souris transgéniques a démontré la présence de fragments de Tau dans le LCS de ces souris, fragments étant pour la plupart clivés en C-terminal et parfois même en N-terminal. De plus, dans leurs modèles de souris transgéniques, la neurodégénérescence n'était pas requise pour observer une élévation de la protéine Tau dans le LCS, démontrant donc que la mort cellulaire ne peut à elle seule expliquer la présence de cette protéine dans l'espace extracellulaire (Barten, Cadelina et al. 2011). Ces résultats laissent donc supposer que la protéine Tau pourrait emprunter une voie

de sécrétion. D'ailleurs, une étude récente réalisée sur les cellules M1C démontre la sécrétion de la protéine Tau par les exosomes (Saman, Kim et al. 2011).

La présence de cette Tau dans le LCS a conduit les chercheurs à tenter de la quantifier afin de savoir si elle pouvait être un bon biomarqueur pouvant différencier la MA de d'autres maladies. Des tests ELISA ont donc été mis sur pied avec différents anticorps contre Tau détectant toutes les isoformes de la protéine indépendamment de son état de phosphorylation. Grâce à ces tests, il a été découvert qu'il y a une augmentation du niveau de Tau totale (tTau) dans le LCS des patients atteints de la MA, allant jusqu'à 2 à 3 fois la quantité retrouvée dans le LCS de personnes âgées non-atteintes de démence (Blennow, Vanmechelen et al. 2001). Ces tests ont par la suite été utilisés afin de détecter le niveau de tTau du LCS dans d'autres maladies, afin de découvrir si ce test pouvait être utilisé comme outil diagnostique pouvant différencier la MA d'autres maladies. Ainsi, ils ont pu voir que dans la maladie de Creutzfeld Jacob (CJD), le LCS contenait entre 10 et 50 fois plus de Tau que les patients témoins en santé (Schraen-Maschke, Sergeant et al. 2008). Par contre, les études menés sur la tTau se trouvant dans le LCS de patients atteints de FTD, de paralysie supranucléaire progressive, de dégénération corticobasale (CBD) et de sclérose latérale amyotrophique ont donné des résultats contradictoires. Certaines études ont en effet démontré une élévation de tTau dans le LCS alors que d'autres études n'ont dénoté aucun changement ou même dans certains cas une diminution (Blennow 2004; Pijnenburg, Schoonenboom et al. 2004; Grossman, Farmer et al. 2005; Jimenez-Jimenez, Hernanz et al. 2005; Brettschneider, Petzold et al. 2006; Bian, Van Swieten et al. 2008; Borroni, Gardoni et al. 2009). Au final, la tTau se trouvant dans le LCS est un bon marqueur pour différencier la MA du CJD et de certaines maladies ne comportant aucune augmentation de tTau dans le LCS (dépression, démence alcoolique) (Brettschneider, Maier et al. 2005; Hein Nee Maier, Kohler et al. 2008). Par contre, cette tTau s'avère ne pas être un bon marqueur pour différencier la MA avec d'autres démences (FTD, CBD, démence de corps de Lewy (LBD)).

Dans ces conditions, les chercheurs se sont penchés sur la présence de la protéine Tau phosphorylée (pTau) dans le LCS afin de voir si cet indicateur ferait un meilleur test diagnostique que la tTau. Toutefois, la Tau phosphorylée était présente en moins grande quantité dans le LCS comparativement à la tTau (Ishiguro, Ohno et al. 1999), rendant la détection de cette population de Tau plus ardue. Malgré ces problèmes, plusieurs sites

phosphorylés de Tau ont pu être détectés dans le LCS, dont entre autre les thréonines 181 et 235 et les sérines 396 et 404. De plus, une légère augmentation de la protéine Tau phosphorylée à ces sites a été notée dans la MA comparativement au LCS de personnes âgées témoins (Blennow and Vanmechelen 2003; Blennow 2004). Un fait intéressant avec cette mesure était le fait que dans certaines maladies où une augmentation de tTau dans le LCS avait été observée, tel la CJD, la FTD, et la LBD, aucune augmentation de pTau n'était présente dans le LCS (Riemenschneider, Wagenpfeil et al. 2003; Blennow 2004; Hampel, Buerger et al. 2004). Ainsi, avec les divers anticorps testés, il a été démontré que la quantité de Tau phosphorylée à T231 était le meilleur biomarqueur afin de différencier la MA de la FTD, et que la phosphorylation au site T181 était le meilleur pour poser un diagnostic différentiel entre la MA et la LBD (Buerger, Zinkowski et al. 2002; Vanderstichele, De Vreese et al. 2006).

1.3. Sécrétion

La sécrétion est un mécanisme permettant de transporter des protéines intracellulaires vers l'espace extracellulaire, soit sous forme libre ou attachées à la membrane plasmique de la cellule. La sécrétion remplit plusieurs fonctions, comme par exemple, au niveau de la signalisation via la sécrétion d'hormones, de neurotransmetteurs ou au niveau de réponse inflammatoire par la sécrétion de molécules inflammatoires, la sécrétion de collagène par les fibroblastes pour maintenir un environnement extracellulaire adéquat, etc. La majorité des protéines sécrétoires possèdent un peptide signal qui leur permet d'être synthétisées directement dans le réticulum endoplasmique (RE) pour ensuite être transportées via le golgi et diverses vésicules vers l'espace extracellulaire ou la membrane plasmique. Cette voie de sécrétion est dite conventionnelle puisque c'est la voie de sécrétion la plus utilisée par la cellule. Par contre, il a été découvert qu'une protéine ne possédant pas cette séquence signal peut tout de même être sécrétée par des voies dites non-conventionnelles.

1.3.1. Voie conventionnelle

Les protéines empruntant cette voie de sécrétion (Figure 5, p.33) possèdent un peptide signal. Ce peptide est reconnu par un complexe se trouvant à la surface du RE qui permet à la protéine d'être synthétisée directement dans la lumière de celui-ci. Ces protéines nouvellement synthétisées vont par la suite quitter le RE par des sites spécialisés faisant partie du RE de transition, appelés les sites de sortie. Ces sites permettent la formation de vésicules recouvertes de COPII («*coat protein complex II*») qui vont amener les protéines du RE jusqu'à l'appareil de golgi, où elles peuvent être modifiées, triées, stockées et/ou envoyées vers leur destination finale (Nickel and Rabouille 2009). Le bon fonctionnement du transport vésiculaire dépend aussi de la formation de vésicules COPI qui servent au transport rétrograde du réseau trans-golgien jusqu'au RE (Rabouille and Klumperman 2005). La fusion des diverses vésicules avec les membranes du RE/golgi se fait grâce aux protéines SNAREs (Pelham 2001). On peut inhiber la voie de sécrétion conventionnelle grâce à la brefeldin A (BFA), un métabolite de champignon agissant sur une Arf GEF, qui empêche la formation des vésicules COPI et ultimement, qui bloque le transport entre le RE et le golgi (Sciaky, Presley et al. 1997).

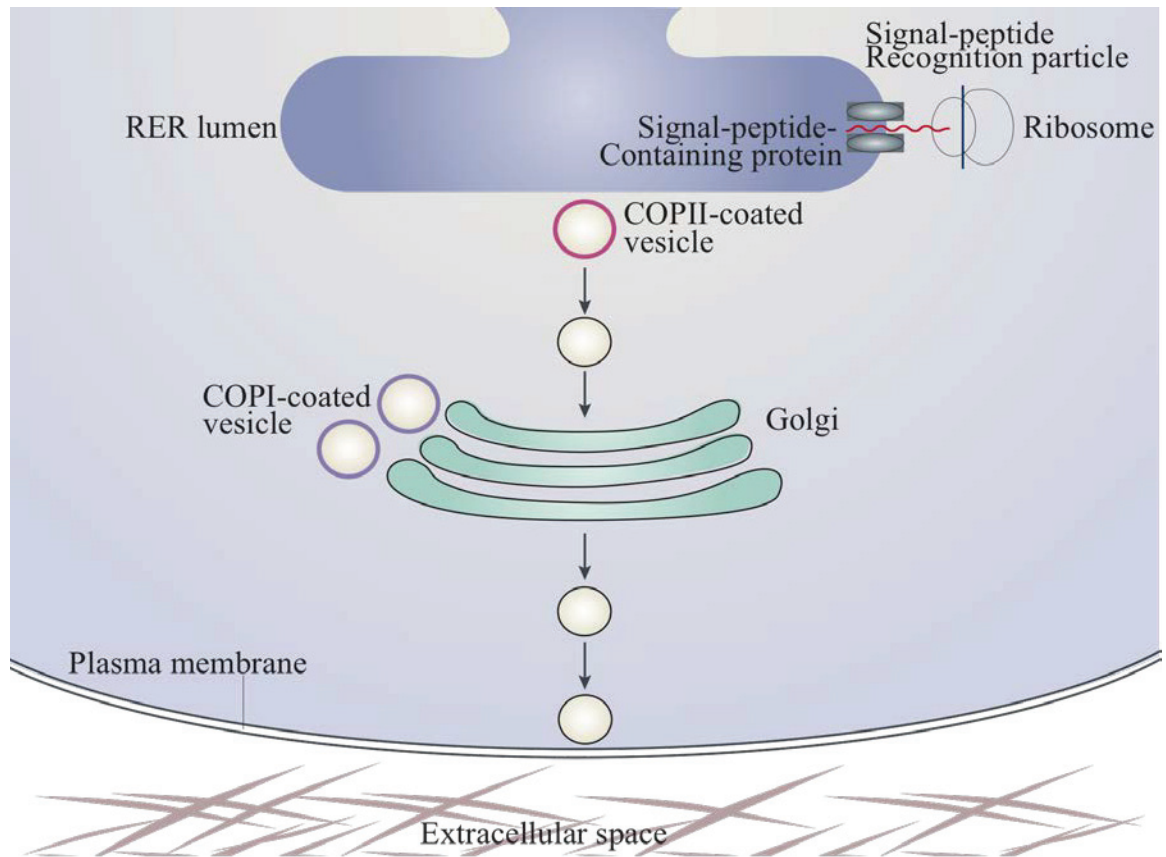
1.3.2. Voies non-conventionnelles

La possession d'un peptide signal est nécessaire pour qu'une protéine puisse emprunter la voie de sécrétion conventionnelle. Par contre, il a été découvert que plusieurs protéines ne possédant pas cette séquence peuvent être sécrétées par des voies dites non-conventionnelles (Flieger, Engling et al. 2003; Merk, Baugh et al. 2009; Nickel and Rabouille 2009). Ces voies de sécrétion ne sont pas encore bien caractérisées et probablement qu'il en reste à découvrir. Voici donc une courte description de quelques unes de ces voies (Figure 6, p.35).

Les protéines cytosoliques peuvent être capturées du cytoplasme lors de la formation de vésicules endosomales internes (voie 1). Les endosomes possédant ces vésicules internes deviennent les corps multivésiculaires (CMVs). Les CMVs sont bien connus pour leur rôle dans la régulation des récepteurs membranaires et dans la dégradation

Figure 5 .Voie de sécrétion conventionnelle.

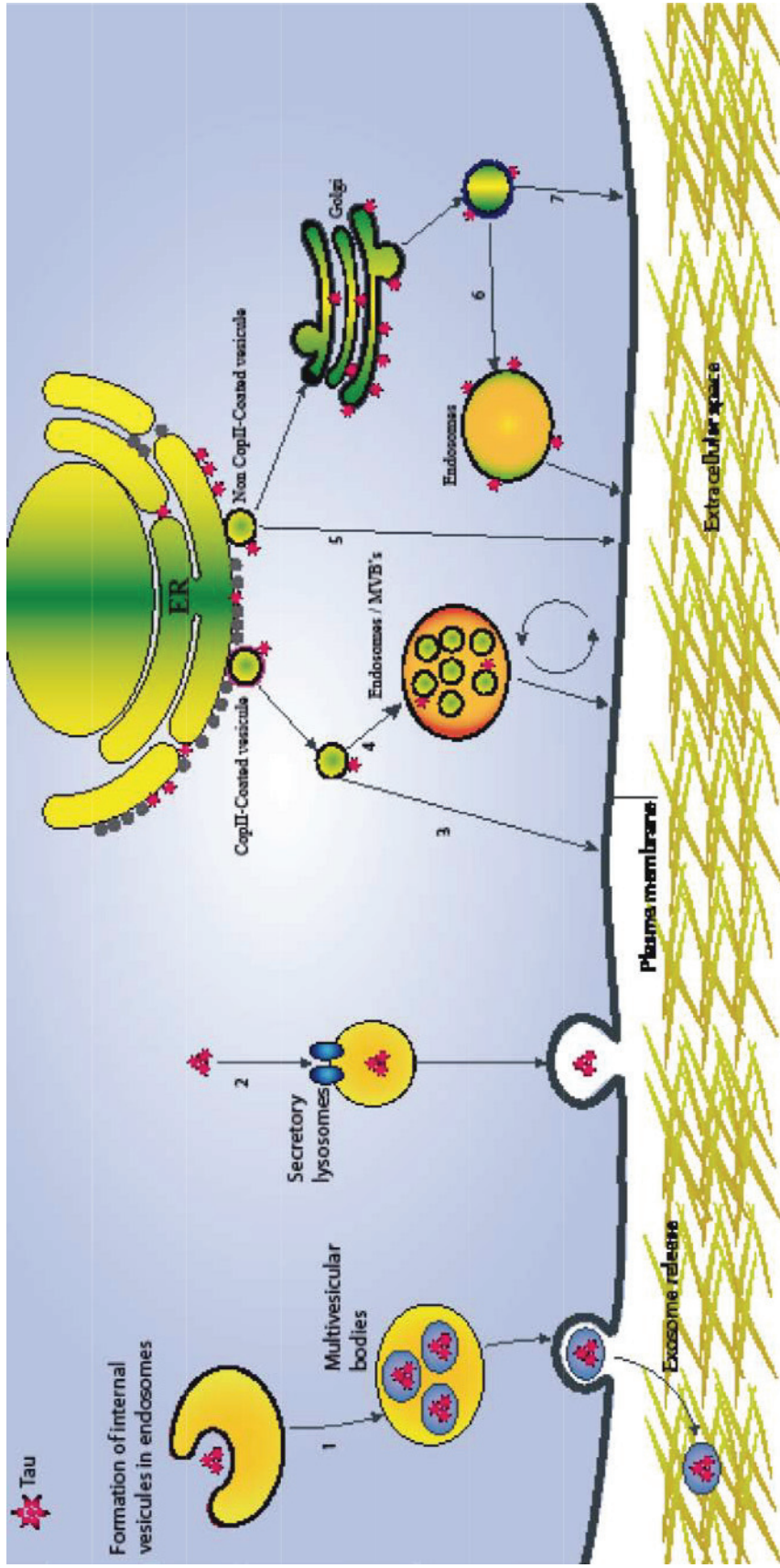
Les protéines contenant un peptide signal sont transportées vers la surface de la membrane cellulaire ou vers l'espace extracellulaire via la voie de sécrétion conventionnelle. Ces protéines entrent dans le RE par une particule de reconnaissance du peptide signal. Après sa synthèse, la protéine quitte le RE par des sites de sorties, là où les vésicules recouvertes de COPII sont formées. La protéine est ainsi transportée jusqu'au golgi où elle peut ultimement être envoyée à la membrane plasmique en vue de sa sécrétion. Les vésicules recouvertes de COPI, tant qu'à elles, permettent le transport rétrograde du golgi jusqu'au RE.



Tiré de Nickel and Rabouille, 2009, Molecular Cell Biology, 10: 148-155

Figure 6. Voies de sécrétion non-conventionnelles.

Représentation schématique de plusieurs voies de sécrétion non-conventionnelles. Voie 1: Une protéine cytosolique est capturée du cytoplasme par la formation de vésicules internes dans les endosomes. Ce processus conduit à la formation de CMVs qui vont par la suite relâcher ces vésicules internes dans le milieu extracellulaire sous forme d'exosomes. Voie 2: Une protéine cytosolique pénètre dans les lysosomes sécrétoires et est relâchée dans l'espace extracellulaire lors de la fusion de ces derniers avec la membrane plasmique. Voie 3: Une protéine attachée aux membranes du RE peut se retrouver à la surface des vésicules recouvertes de COPII lorsque celles-ci se forment. Ces vésicules peuvent, par la suite, fusionner à la membrane plasmique pour la sécrétion. Voie 4: Les vésicules recouvertes de COPII peuvent aussi fusionner aux CMVs et ensuite être sécrétées sous forme d'exosomes. Voie 5: Des vésicules non-COPII peuvent se former à la surface du RE et fusionner directement à la membrane plasmique pour permettre la sécrétion des protéines attachées à leur surface. Voie 6: Ces vésicules non-COPII peuvent aussi être envoyées au golgi. Les protéines attachées à leur membrane se retrouvent donc attachées au golgi et peuvent se retrouver sur les vésicules recouvertes de clathrines lorsque celles-ci se forment à la surface de ce dernier. Ces vésicules peuvent, par la suite, être envoyées à un endosome pour ensuite être sécrétées. Voie 7: Les vésicules recouvertes de clathrines peuvent aller directement à la membrane plasmique pour permettre la sécrétion.



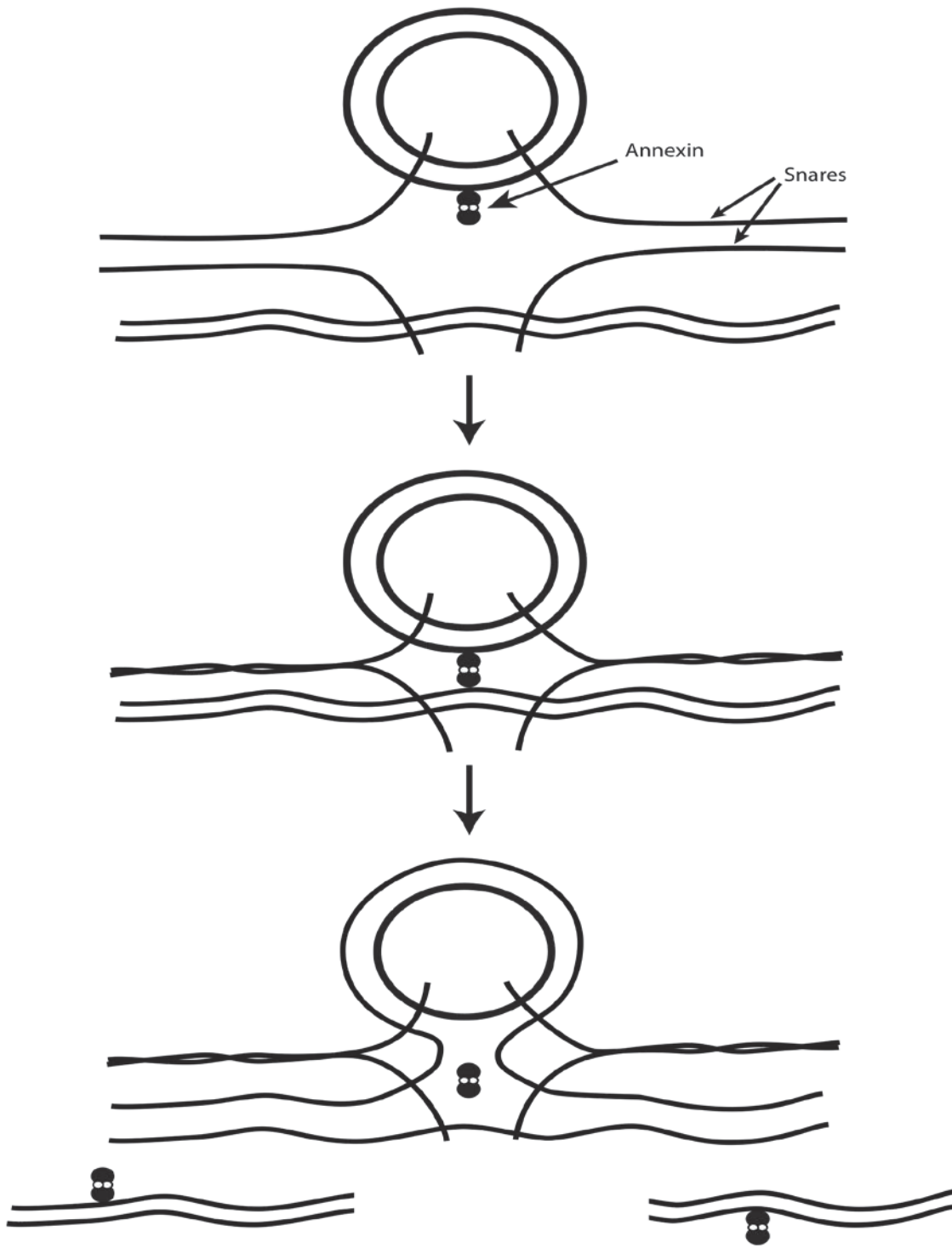
de protéines (Gruenberg and Stenmark 2004; Piper and Katzmann 2007). De plus, on sait qu'ils peuvent relâcher leurs vésicules internes dans l'espace extracellulaire. Les vésicules ainsi sécrétées se nomment les exosomes. L'interleukine 1 β (IL-1 β) mature est connue comme utilisant, entre autres, cette voie de sécrétion. L'IL-1 β est activée dans le cytoplasme par sa liaison à la caspase-1 avant d'être capturée par l'endosome et ainsi sécrétée (Qu, Franchi et al. 2007). Une voie similaire est empruntée par la protéine Acb1. Cette protéine cytosolique se retrouve dans les CMVs par le processus d'autophagie (Duran, Anjard et al. 2010; Manjithaya, Anjard et al. 2010). Ce processus a lieu dans les cas physiologiques et de privation de nutriments. Elle sert entre autre à la dégradation d'organelles endommagées ou à la génération de nutriments par la dégradation via des enzymes telles les hydrolases, du contenu des autophagosomes pour une future utilisation par la cellule (Xie and Klionsky 2007; Nakatogawa, Suzuki et al. 2009). Un autre exemple de protéine empruntant cette voie est l' α -synucléine, impliquée dans la maladie du Parkinson, qui est aussi sécrétée par les exosomes (Emmanouilidou, Melachroinou et al. 2010). Les protéines cytosoliques peuvent aussi, dans certains cas, pénétrer dans les lysosomes sécrétoires, des vésicules possédant à la fois les propriétés de lysosome et de granule de sécrétion (voie 2). L'IL-1 β peut aussi emprunter cette voie pour être sécrétée. En effet, durant une réponse inflammatoire, IL-1 β peut être synthétisée et transloquée avec la caspase-1 dans les lysosomes sécrétoires. Par contre, la nature des transporteurs permettant cette translocation est encore inconnue (Andrei, Dazzi et al. 1999; Andrei, Margiocco et al. 2004).

Les voies de sécrétion non-conventionnelles 4 à 7 de la figure 6, tant qu'à elles, illustrent par quelles voies une protéine attachée du côté cytosolique d'une membrane peut se retrouver à la membrane plasmique pour ultimement être sécrétée. Les protéines ainsi attachées aux membranes pourraient être sécrétées via un mécanisme similaire à celui utilisé par la protéine Annexine A2 (Figure 7, p.39). Cette protéine est ancrée du côté cytosolique sur la membrane des vésicules. Lorsque la vésicule fusionne avec la membrane plasmique, Annexine A2 se retrouve dans la portion hydrophobe de la membrane, phénomène possible grâce à sa forte liaison avec la membrane. À la fin du processus de fusion, Annexine A2 est expulsée de la région hydrophobe. Selon cette théorie, la protéine aurait autant de chance d'être expulsée du côté cytosolique que du côté extracellulaire. Au final, une certaine portion de l'Annexine A2 retourne dans la cellule tandis que l'autre

portion se retrouve du côté extracellulaire de la membrane plasmique. Le mécanisme ainsi proposé pourrait s'appliquer à d'autres protéines sécrétées de façon non-conventionnelles, en autant qu'elles aient une affinité suffisante à la membrane pour ne pas être éjectées lors du processus de fusion des membranes (Danielsen, van Deurs et al. 2003). Dans cette optique, une protéine attachée au RE peut être directement amenée à la membrane plasmique par des vésicules COPII (voie 3), mécanisme observé lors de la sécrétion de la protéine CFTR («*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*») (Wang, Matteson et al. 2004). Une protéine pourrait aussi être amenée à la membrane plasmique via des vésicules non-recouvertes (voie 5). Les vésicules recouvertes de COPII pourraient aussi fusionner à des endosomes/CMVs pour ainsi être amenés à la membrane plasmique (voie 4). Les voies 6 et 7, tant qu'à elles, reflètent le passage des protéines du RE jusqu'au golgi pour ensuite se retrouver à la surface de vésicules recouvertes de clathrine qui peuvent soit aller directement à la membrane ou passer par les endosomes pour ensuite fusionner à la membrane plasmique.

Figure 7. Modèle de sécrétion de la protéine Annexine A2 lorsqu'attachée à la surface d'une vésicule.

Après l'attachement de la membrane vésiculaire à la membrane plasmique grâce aux SNAREs, les deux bicouches lipidiques viennent en apposition directe l'une sur l'autre. Lorsque les deux membranes fusionnent ensemble pour former une jonction, la protéine à la surface de la vésicule se retrouve dans la région hydrophobe des deux membranes. Alors que le processus de fusion se termine, l'Annexine A2 peut être expulsée de l'intérieur de la jonction des membranes, pour se retrouver soit du côté interne ou externe de la membrane plasmique.



Tiré de Danielsen et al., 2003, *Biochemistry*, 42:14670-76

1.4. Objectifs de l'étude

Tel que mentionné précédemment, on sait que dans la MA les NFTs se propagent dans le cerveau dans un ordre bien précis (Lace, Savva et al. 2009; Brundin, Melki et al. 2010). De plus, l'injection d'extraits de cerveaux de souris transgéniques, contenant des NFTs de Tau mutée en P301S, dans le cerveau de souris transgéniques surexprimant une forme sauvage de Tau (souris ne développant pas de NFTs) cause l'assemblage en filaments de la protéine Tau de type sauvage et la propagation de la pathologie à différentes régions voisines du cerveau (Clavaguera, Bolmont et al. 2009). D'ailleurs, on sait que la protéine Tau se trouve dans le LCS humain, et ce même en l'absence de pathologie (Mattsson, Zetterberg et al. 2009). Toutes ces observations ont mené à l'hypothèse selon laquelle la protéine Tau, bien que cytosolique, pourrait être sécrétée par les neurones. Ensuite, la protéine Tau extracellulaire pourrait être endocytée par les neurones avoisinants et induire la pathologie dans ces cellules. Selon cette théorie, la pathologie de Tau pourrait ainsi se propager aux différentes régions du cerveau, tel qu'observé dans la MA. Par ailleurs, quelques études ont déjà été publiées sur la sécrétion de Tau dans différentes lignées cellulaires (Kim, Lee et al. 2010; Kim, Lee et al. 2010). Le problème majeur de ces études est la faible qualité des tests de mort utilisés. De ce fait, bien que ces études soient encourageantes, elles ne prouvent pas que la présence de Tau à l'extérieur des cellules ne soit pas simplement due à la fuite de la protéine lors de la mort cellulaire. Par contre, le Dr Hall a réussi à démontrer la présence de la protéine Tau dans des exosomes, démontrant de ce fait la sécrétion de Tau par cette voie (Saman, Kim et al. 2011). Les résultats obtenus lors de cette étude suggèrent que la protéine pourrait en plus être sécrétée par un mécanisme indépendant des exosomes, bien que celui-ci n'ait pas encore été investigué.

L'objectif de la présente étude était donc de prouver la sécrétion de la protéine Tau, en démontrant que la mort cellulaire n'en était pas responsable. Nous avons aussi voulu examiner le mode de sécrétion de la protéine et analyser les modifications post-traductionnelles, tel le clivage et la phosphorylation, présentes sur celle-ci lorsqu'elle se trouve en intracellulaire comparativement à lorsqu'elle est sécrétée. Pour ce faire, nous avons utilisé trois modèles cellulaires différents : les cellules HeLa que nous avons transfectées avec la GFP-Tau4R 0N, les cellules PC12 stablement transfectées avec cette même Tau ainsi que les neurones corticaux de souris de type sauvage non-transfectés. Les cellules HeLa ainsi que les PC12 offraient plusieurs avantages, dont entre autre le fait

qu'elles pouvaient surexprimer la protéine Tau de façon abondante et qu'elles pouvaient sécréter une quantité importante de Tau. Tous ces avantages nous ont permis d'analyser les modifications post-traductionnelles de la protéine Tau sécrétée. Les neurones primaires tant qu'à eux représentaient un modèle de choix étant donné que ces neurones sont atteints dans la maladie d'Alzheimer. De plus, ces neurones nous ont permis d'étudier la sécrétion de la protéine Tau endogène sans sa surexpression. Cependant, ce modèle sécrétant une quantité faible de Tau, il nous limitait dans l'étude des modifications post-traductionnelles de la protéine Tau sécrétée. En utilisant trois modèles cellulaires, nous avons pu caractériser l'état de phosphorylation et de clivage de la protéine Tau sécrétée et les mécanismes impliqués dans sa sécrétion.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1. PLASMIDES D'EXPRESSION

L'isoforme adulte humaine de 383 acides aminés (a.a.) à 4 répétitions de Tau a été fusionnée en N-terminal à la GFP (GFP-Tau4R) dans le plasmide pEGFP-C1 (Lu and Kosik 2001). Cette même isoforme de Tau4R a également été fusionnée à Flag en N-terminal (Flag-Tau4R) dans le vecteur fpRc/CMV (Leger, Brandt et al. 1994), une modification de pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA). Finalement, les mutants GFP-E12 et GFP-A12 ont été modifiés à partir de la construction GFP-Tau4R dans notre laboratoire. La construction GFP-Tau4R a été fournie par le Dr K. Kosik (University of California, Santa Barbara, CA, USA). Le plasmide fpRc/CMV a tant qu'à lui été gracieusement fourni par le Dr G. Lee (Université d'Iowa, Iowa, IA).

2.2. CULTURES CELLULAIRES

Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS de HyClone, Logan, UT) et 200 mM de L-glutamine (Sigma, Oakville, ON, Canada). Pour la transfection, elles ont étéensemencées à une densité de $1,14 \times 10^6$ cellules par plat de pétri 60 mm et gardées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂.

Les cellules PC12 utilisées, aimablement fournies par le Dr R Brandt, sont stablement transfectées avec de la GFP-Tau4R et un gène de résistance à la Généticine. Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de FBS, 5% de sérum de cheval (HS de HyClone, Logan, UT), 292 µg/mL de L-glutamine, 250 µg/mL de Généticine (Sigma) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco, Invitrogen). Elles ont étéensemencées à une densité approximative de 3×10^6 cellules par plat de pétri de 60 mm et gardées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂.

Les cultures primaires de neurones de cortex ont été préparées selon le protocole décrit précédemment (Banker 1998). Des cortex de fœtus de souris âgées de 16 ou 17 jours ont été traités avec une solution de DNase (10 mg/mL) et de trypsine 0,25% à 37°C pour 15 minutes, puis lavés dans de la solution balancée de Hank. Les cortex ont ensuite été

découpés en petits morceaux et dissociés par plusieurs passages à travers une pipette Pasteur à diamètre réduit. Les cellules ont ensuite été déposées à une densité de 3×10^6 cellules par plat de pétri de 60 mm recouvert de poly-L-lysine (Sigma, Oakville, ON, Canada). Les cellules ont été laissées pendant 4 heures dans du DMEM contenant 10% de HS afin de permettre l'attachement des cellules sur le substrat. Le milieu a ensuite été changé pour du Neurobasal (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) auquel a été ajouté des suppléments de L-glutamine (SIGMA, Oakville, ON, Canada) et de B27 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

2.3. TRANSFECTION

Une journée après la mise en culture des cellules HeLa, elles ont été transfectées avec la GFP, la GFP-Tau4R, la Flag-Tau4R ou les différents mutants de Tau, en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Brièvement, pour chaque pétri 60 mm, la solution d'ADN contenait 8 μ g d'ADN plasmidique dilués dans 500 μ l de milieu Opti-MEM. La seconde solution contenait 16 μ l de Lipofectamine 2000 dilués dans 500 μ l de milieu Opti-MEM. Les deux mixtures ont été incubées pendant 5 minutes, puis mélangées ensemble et laissées de côté pour 20 minutes. Chaque pétri de cellules a par la suite reçu 1 ml de la solution finale. Le milieu de culture des cellules a finalement été changé 4 heures après la transfection.

2.4. IMMUNOBUVARDAGE

À 48 heures après la transfection, le milieu de culture des HeLa a été récolté puis centrifugé à 3000 RPM pendant 10 minutes à température pièce afin de se débarrasser des débris cellulaires. Immédiatement après que le milieu ait été ramassé, le tapis cellulaire a été lavé deux fois avec du PBS chauffé à 37°C et une fois avec du PBS contenant 0,5 M de NaCl. Les cellules HeLa ont ensuite été lysées dans du milieu de culture contenant 0,1% triton X-100 et une tablette d'un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete EDTA-free de Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). La quantité de milieu de lyse utilisé est égale à la quantité de milieu de culture récolté du pétri. Les cellules ont ensuite été grattées et incubées sur glace pendant 10 minutes pour permettre la lyse cellulaire complète. La

solution a ensuite été centrifugée à 3000 RPM pendant 10 minutes à température pièce. Le même protocole de récolte fut utilisé pour les neurones et les cellules PC12, à la différence que les neurones ont été récoltés 10 à 13 jours après leur mise en culture et les PC12 trois jours après. Le milieu de culture et le lysat des neurones, des PC12 ainsi que quelques échantillons provenant des HeLa ont d'abord dû subir une immunoprécipitation avant de passer aux étapes d'immunobuvardage. Les milieux de culture ainsi que les lysats ont donc été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7,5% et transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les standards de poids moléculaires utilisés proviennent de Bio-Rad («*Precision Plus Protein standards*»). Les membranes ont ensuite été bloquées dans du lait 5% dilué dans du TBST 1X («*Tris buffered saline*» avec 0,1% de Tween-20) puis marqué avec différents anticorps anti-Tau (voir Tableau I, p.46). Des anticorps dirigés contre la GFP (mélange des clones 7,1 et 13,1 , monoclonal souris, 1 :1000) (Roche Diagnostic), l' α -tubuline (clone DM1A, monoclonal souris, 1 :2000) (Sigma) et la γ -actine (polyclonal lapin, 1 :50 000) (aimablement fournie par le Dr C. Bulinski, Columbia University, NY, USA) ont aussi été utilisés. Les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C sous agitation. Elles ont ensuite été lavées dans le TBST 1X, puis incubées 1 heure avec l'anticorps secondaire dirigé contre la souris ou le lapin (dépendant de l'anticorps primaire utilisé) et couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch Laboratories, Cedarlane Laboratories Limited, Hornby, Ontario). Les membranes ont finalement été lavées et révélées par chimiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Quebec, Quebec, Canada).

2.5. IMMUNOPRÉCIPITATION

Des billes magnétiques couplées à des anticorps secondaires anti-souris (*DYNAL Biotech*, Dynabeads[®] M-280 Sheep anti-Mousse IgG), ont été incubées pendant la nuit avec un mélange d'anticorps primaires dirigés contre Tau : 0,3 μ g Tau-1, 6 μ l de CP13 (généreusement fourni par le Dr P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA) et 0,1 μ g de HT7. Les billes magnétiques ont ensuite été incubées pendant deux heures avec agitation lente sur la roue avec le milieu de culture ou le lysat cellulaire de cellules HeLa, PC12 ou de neurones corticaux. Après incubation avec les échantillons,

Tableau I. Liste des anticorps dirigés contre Tau et dilution utilisée pour immunobuvardage

Anticorps	Type	Épitope	Dilution (µg/ml)	Source
AbCam (ab64193)	Polyclonal Lapin	Autour de la S262	0.67	Abcam, Cambridge, MA, USA
HT7	Monoclonal souris	Entre les a.a. 159-163	0.40	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
K9JA	Polyclonal lapin	a.a. 243-441	0.31	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Tau1	Monoclonal souris	a.a. déphosphorylés 195, 198, 199 and 202	n/a	Millipore, Billerica, MA, USA
Tau12	Monoclonal souris	Entre les a.a. 9-18	0.1 – 0.025	Abcam
Tau46	Monoclonal souris	a.a. 428-441	1.0	Abcam
AT270	Monoclonal souris	pT181	2.0	Pierce Biotechnology
Phospho-S199	Polyclonal lapin	pS199	1 µl/ml	Biosource-Invitrogen, Burlington, ON, Canada
CP13	Monoclonal souris	pS202	20 µl/ml	Aimablement fourni par le Dr P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA
Phospho-T205	Polyclonal lapin	pT205	2 µl/ml	Biosource-Invitrogen
Phospho-T212	Polyclonal lapin	pT212	1 µl/ml	Biosource-Invitrogen
Phospho-S214	Polyclonal lapin	pS214	10 µl/ml	Biosource-Invitrogen
Phospho-T217	Polyclonal lapin	pT217	0.75	Biosource-Invitrogen
Phospho-S262	Polyclonal lapin	pS262	1.0	Signalway antibody, Pearland, TX, USA
Phospho-S409	Polyclonal lapin	pS409	10 µl/ml	Biosource-Invitrogen
Phospho-S422	Polyclonal lapin	pS422	1 µl/ml	Biosource-Invitrogen
AT180	Monoclonal souris	pT231/pS235	2.0	Pierce Biotechnology
PHF-1	Monoclonal souris	pS396/pS404	10 µl/ml	Fourni par le Dr P. Davies

les billes magnétiques ont été lavées plusieurs fois au PBS, puis bouillies dans du tampon Laemmli 1X afin de décrocher toutes les protéines attachées. L'échantillon de protéines obtenu a ensuite été analysé par immunobuvardage, tel que décrit plus tôt.

2.6. QUANTIFICATION PAR DENSITOMÉTRIE DU SIGNAL DÉTECTÉ

Les films ont été scannés avec un scanner EPSON PERFECTION 1240U et un module de transparence EPSON EU-33, en utilisant la version 7,0 du logiciel Adobe Photoshop. Le logiciel Image J version 1,38X du «*National Institute of Health*» a été utilisé pour quantifier l'intensité des bandes obtenues suite à l'immunobuvardage. Pour quantifier la proportion de Tau sécrétée dans une condition précise, nous avons fait le ratio de la quantité de Tau dans le milieu sur la quantité de Tau dans le lysat. Par la suite, afin d'évaluer si la sécrétion était plus élevée dans une condition que dans une autre, le ratio de la quantité de Tau sécrétée dans les deux conditions a été effectué et la moyenne des ratios \pm l'écart type a été calculée pour chaque condition. La fiabilité statistique des résultats a été évaluée grâce à un test t à un échantillon avec une moyenne hypothétique de 1 en utilisant le logiciel GraphPad InStat 3.

2.7. TRAITEMENTS

Deux jours après la transfection, le milieu de culture des cellules HeLa a été changé pour du frais et les cellules ont été traitées à la BFA (Sigma) à une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$, dilué dans 0,05% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Sigma) pendant 45 minutes, 5 ou 6 heures et à 10 $\mu\text{g/ml}$ pendant 5 ou 6 heures. Les cellules témoins ont été traitées avec 0,05% DMSO. Alternativement, les cellules ont été incubées à différentes températures. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées dans des flasques de 25 cm^2 au lieu des pétris de 60 mm. Deux jours après la transfection, le milieu de culture a été changé pour du frais et les cellules ont été incubées à 22, 18 ou 4°C pour 6 heures. Les cellules témoins, tant qu'à elles, ont été incubées à 37°C.

Deux jours après la mise en culture des cellules PC12, leur milieu de culture a été changé pour du frais et les cellules ont été traitées avec diverses drogues. Les cellules ont donc été traitées soit avec 100 nM de thapsigargine diluée dans du DMSO ou 10 μ M de rapamycine diluée dans le DMSO pendant 6 heures, soit avec 100 μ M de leupeptine diluée dans l'eau ou une combinaison de 100 μ M de leupeptine et 10 μ M de rapamycine pendant 24 heures. Finalement, les cellules ont été incubées dans un milieu de culture contenant 5 fois moins de FBS et de HS que le milieu normal afin de diminuer la quantité de nutriments.

Les traitements sur les neurones ont été effectués 10 à 13 jours après leur mise en culture et le milieu a été changé pour du frais avant chaque traitement. Les neurones ont donc été traités avec soit 100 nM de Thapsigargine, 15 nM de rapamycine ou une diminution de nutriments par l'incubation des cellules dans du milieu de culture contenant 5 fois moins de B27 que le milieu normal, pendant 6 heures. Elles ont aussi été traitées avec les solutions K5 et K50 (voir Tableau II, p.49) pendant 3 heures ou avec 40 μ M de leupeptine ou une combinaison de 20 μ M de leupeptine et 15 nM de rapamycine pour 24 heures. Toutes les drogues utilisées provenaient de Sigma (Oakville, ON, Canada).

2.8. TEST DE CYTOTOXICITÉ

La mort cellulaire a été calculée en analysant l'intégrité de la membrane plasmique des cellules en mesurant l'activité de la lactate déhydrogénase (LDH) extra et intracellulaire grâce à un kit de mesure de la cytotoxicité (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), en suivant les instructions du manufacturier. Le pourcentage de mort cellulaire a été calculé en faisant le ratio de l'activité de la LDH extracellulaire sur l'activité totale de la LDH (milieu + lysat). Des triplicatas ont été effectués pour chaque échantillon. L'activité de la LDH a été mesurée grâce à un lecteur de plaque BIO-TEK Elx800. Les résultats obtenus sont présentés en pourcentage moyen \pm l'écart type.

Tableau II. Constituants des solutions K5 et K50 dilués dans l'eau.

Solution	K5	K50
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,8 mM	1,8 mM
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,8 mM	0,8 mM
NaCl	110 mM	65 mM
NaHCO ₃	26 mM	26 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	1 mM	1 mM
D-Glucose	40 mM	40 mM
Hépès pH 7.3	15 mM	15 mM
KCl	5 mM	50 mM

3. RÉSULTATS

3.1. La protéine Tau est sécrétée dans un modèle de cellules HeLa

3.1.1. Expression de la GFP-Tau4R

Afin de vérifier la sécrétion de la protéine Tau, nous l'avons tout d'abord surexprimée dans des cellules HeLa, une lignée cellulaire immortalisée provenant d'un adénocarcinome humain (Masters 2002). Pour ce faire, les cellules ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec un vecteur d'expression qui contenait l'ADNc de l'isoforme de la protéine Tau humaine Tau4R 0N fusionné à un tag GFP en N-terminal ou avec différents mutants de cette GFP-Tau4R. Les cellules ont ensuite été lysées 48 heures après la transfection et le lysat a été mis sur gel pour immunobuvardage afin de vérifier l'expression de Tau (Figure 8/A, p.52). Les anticorps anti-Tau HT-7, Tau12 et un anticorps polyclonal obtenu de AbCam ont été utilisés pour analyser l'expression de la protéine Tau humaine par les cellules HeLa. Ces anticorps sont dirigés contre Tau aux acides aminés (a.a.) 159 à 163 pour le HT7, 9 à 18 pour Tau12 et dans une région entourant la S262, localisée dans la première répétition du domaine de liaison aux microtubules pour l'anticorps de AbCam. La GFP-Tau4R a migré au poids moléculaire attendu, soit tout juste au-dessus de 75 kDa. On peut aussi observer la présence de plusieurs bandes sous 75 kDa, dénotant le clivage de la protéine Tau dans les cellules HeLa. Des bandes non-spécifiques ont été détectées avec l'anticorps AbCam à un poids moléculaire environnant les 250, 150 et 50 kDa. Ces bandes ont été identifiées en comparant le motif des bandes obtenu dans le lysat des cellules HeLa transfectées avec GFP puisque ces cellules ne contiennent aucune Tau endogène.

3.1.2. Sécrétion de la GFP-Tau4R

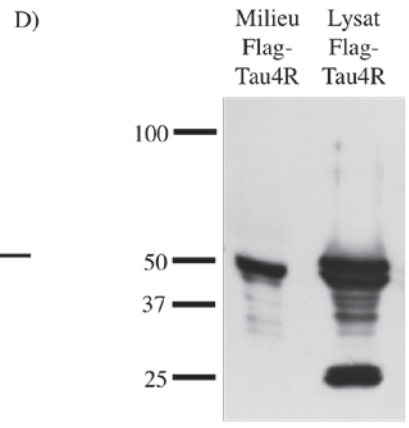
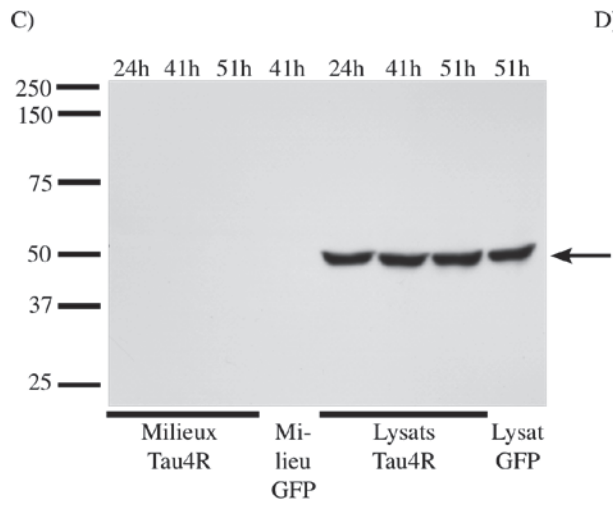
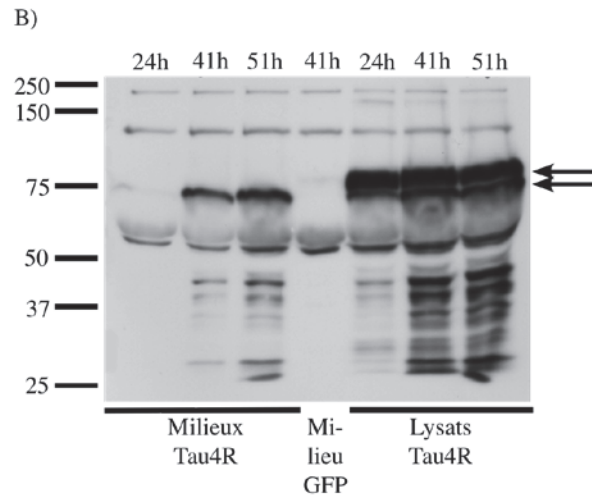
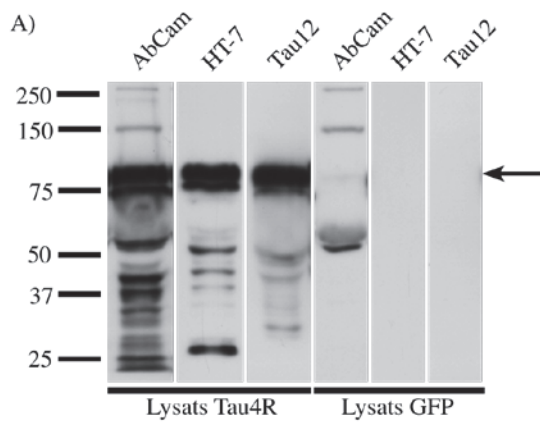
Pour étudier la sécrétion, les cellules ont été transfectées 24h après avoir été mises en culture. Le milieu de culture des cellules contenant la protéine Tau sécrétée a été récolté entre 24 et 51 heures après la transfection. Les cellules ont été lysées dans un volume de 6 ml de milieu frais contenant 0,1% de triton et des inhibiteurs de protéases

puisque le milieu de culture récolté était de 6 ml. Cette méthode a permis de diluer la protéine Tau et les autres composants intra et extracellulaires de la même façon pour ainsi permettre de comparer leur quantité dans le lysat et le milieu. Les milieux et lysats ainsi récoltés ont ensuite été analysés par immunobuvardage avec l'anticorps polyclonal de AbCam dirigé contre Tau (Figure 8/B , p.52). L'expression de Tau, tel qu'observé dans le lysat cellulaire, était équivalente pour les cellules récoltées entre 41 et 51 heures. Par contre, l'expression de Tau à 24 heures était moins grande que ces dernières, tel qu'attendu. À tous ces temps, on a pu observer dans les lysats cellulaires la présence de la bande de Tau pleine longueur, tout juste au-dessus du 75 kDa. De plus, on a pu observer la présence d'une bande de Tau à 75 kDa, sous la protéine Tau pleine longueur, ainsi que des bandes de plus faibles poids moléculaire entre 25 et 50 kDa. On a pu voir que dès 24 heures après la transfection la protéine Tau apparaissait dans le milieu de culture. La quantité de Tau extracellulaire augmentait de façon importante à 41 heures et encore un peu à 51 heures. Par contre, on a pu remarquer que la bande principale de Tau dans le milieu se trouvait à 75 kDa, donc tout juste sous la protéine Tau pleine longueur. Cette dernière était d'ailleurs présente uniquement dans le lysat cellulaire. De plus, on a pu remarquer que les bandes de Tau clivée se trouvant sous les 50 kDa dans le lysat cellulaire étaient également présentes dans le milieu de culture. Ces résultats ont donc suggéré que la protéine Tau était sécrétée sous forme clivée uniquement, la pleine longueur n'étant pas sécrétée dans ce modèle cellulaire.

Par contre, il a fallu démontrer que la présence de Tau dans le milieu de culture n'était pas due à la fuite de protéines à travers la membrane plasmique de cellules endommagées ou mortes. Pour vérifier l'intégrité de la membrane plasmique, nous avons donc regardé si une protéine cytosolique non-sécrétée pouvait se retrouver dans le milieu de culture de nos échantillons. Si c'était le cas, cela aurait signifié que la membrane laissait échapper des protéines cytosoliques et par conséquent que la présence de Tau dans le milieu n'était pas due à la sécrétion. Les échantillons ont donc été repris et marqués à la tubuline grâce à l'anticorps DM1A (Figure 8/C, p.52). On a donc pu voir que la tubuline était présente dans tous les lysats cellulaires mais complètement absente des milieux de culture. Ceci démontrait une bonne intégrité de la membrane plasmique et démontrait donc que la protéine Tau a emprunté un mécanisme cellulaire de sécrétion afin d'être libérée dans le milieu de culture.

Figure 8. Sécrétion de la protéine GFP-Tau4R dans des cellules HeLa.

A) Les cellules HeLa ont été transfectées avec de la GFP-Tau4R ou la GFP seule et lysées 48 heures plus tard. Les cellules transfectées à la GFP nous ont servi de témoin négatif afin de détecter d'éventuelles bandes non-spécifiques avec les anticorps dirigés contre Tau puisque les cellules HeLa sont dépourvues de Tau endogène. Le lysat a été analysé par immunobuvardage afin d'examiner le niveau de transfection et de vérifier la spécificité de nos anticorps. On a donc pu observer la bande de GFP-Tau4R pleine longueur tout juste au-dessus de 75 kDa (flèche) ainsi que plusieurs bandes de plus faibles poids moléculaire indiquant que la GFP-Tau4R était clivée dans les cellules HeLa. L'anticorps HT7, Tau12 ainsi qu'un anticorps dirigé contre Tau obtenu de AbCam ont été testés. Ces deux premiers étaient très spécifiques alors que l'anticorps de AbCam présentait un marquage non-spécifique un peu en haut de 50 kDa ainsi que deux bandes dans les environs de 150 et 250 kDa. **B)** Le milieu de culture des cellules HeLa transfectées avec GFP-Tau4R a été collecté à 24, 41 et 51 heures après la transfection puis les cellules ont été lysées. L'anticorps de AbCam nous a révélé que la protéine Tau était présente dans le milieu des cellules exprimant la GFP-Tau4R mais pas dans celui des cellules exprimant GFP (flèche du bas). Fait intéressant, la protéine Tau pleine longueur (flèche du haut) n'était présente que dans le lysat et non dans le milieu. **C)** Pour vérifier que la protéine Tau observée dans le milieu ne provenait pas d'une fuite à travers la membrane plasmique des cellules due à la mort cellulaire, les échantillons ont été marqués à la tubuline. Aucune tubuline n'a été détectée dans les milieux de culture alors qu'elle était présente dans les lysats cellulaires (flèche, 50 kDa). Il est important de préciser que le lysat a été fait dans 6 ml afin d'avoir le même volume que dans notre milieu de culture et d'ainsi pouvoir comparer le signal obtenu avec l'anticorps anti-tubuline. **D)** Pour éliminer la possibilité que ce soit le tag GFP qui soit la cause de la sécrétion de Tau, les cellules HeLa ont été transfectées avec de la Flag-Tau4R. Cette Tau était aussi présente dans le milieu de culture avec un clivage semblable à ce qui a été observé pour la GFP-Tau4R.



Après avoir ainsi démontré la sécrétion de Tau, il était important de vérifier que cette sécrétion n'était pas due à la présence du tag GFP. En effet, une étude avait démontré que la GFP pouvait être sécrétée par plusieurs types cellulaires (Tanudji, Hevi et al. 2002). Il était alors impératif de prouver que la sécrétion de la protéine Tau n'était pas due à un effet d'entraînement par la GFP. Pour ce faire, nous avons transfecté les cellules HeLa avec la Tau4R contenant le tag Flag en N-terminal, au lieu du tag GFP (Figure 8/D, p.52). Nous avons ainsi pu observer que la Flag-Tau4R, migrant à 50 kDa dû au très faible poids moléculaire de la Flag ne contenant que 8 a.a. (Hopp, Prickett et al. 1988), était tout autant sécrétée que la GFP-Tau4R. De plus, comme observé pour la protéine Tau fusionnée au tag GFP, la Flag-Tau4R sécrétée était également clivée. Ces résultats démontraient donc que la sécrétion de la GFP-Tau4R n'était pas imputable au tag GFP.

3.1.3. Validation de la technique de détection de la mort cellulaire

Afin de démontrer sans équivoque que la protéine Tau était sécrétée par les cellules HeLa, nous devons démontrer que la présence de Tau dans le milieu de culture n'était pas liée à la mort des cellules. De ce fait, nous avons voulu trouver une technique de détection de la mort cellulaire fiable et précise. Premièrement, nous avons induit la mort d'un faible pourcentage de cellules HeLa exprimant la protéine Tau humaine en ajoutant au milieu de culture une solution de 0,01% de Triton X-100 pendant un très court laps de temps de 15 secondes. Nous avons ensuite récolté le milieu pour analyser par immunobuvardage les échantillons recueillis avec l'anticorps HT7 dirigé contre Tau, DM1A dirigé contre la tubuline ainsi qu'un anticorps dirigé contre la γ -actine. L'anticorps HT7 a été privilégié à l'anticorps de AbCam puisqu'il permettait l'obtention d'un plus beau marquage avec moins de bandes non-spécifiques. Le marquage contre Tau a permis de révéler que la bande de Tau pleine longueur au-dessus de 75 kDa apparaissait dans le milieu suite à la lyse partielle des cellules par la solution de Triton X-100, mais plus faiblement que dans le lysat total des cellules (Figure 9/A, p.56). Cela laissait supposer que la présence de la protéine Tau pleine longueur dans le milieu de culture pourrait être un bon indicateur de la mort cellulaire. Le marquage de la tubuline tant qu'à lui a révélé que celle-ci était relâchée dans le milieu de culture suite à l'incubation des cellules avec la solution de Triton X-100. En effet, une faible bande était détectée par l'anticorps contre la tubuline

dans le milieu de culture après une longue exposition (Figure 9/B, p.56). Ce marquage très faible indiquait qu'il faut beaucoup de mort cellulaire afin de voir apparaître un signal fort de tubuline dans le milieu. Le fait que la bande de Tau pleine longueur apparaissait de façon beaucoup plus forte que la bande de la tubuline dans le milieu de culture des cellules ayant subi la lyse partielle suggérait que la présence de la protéine Tau pleine longueur dans le milieu pourrait être un meilleur indicatif de mort cellulaire que la présence de tubuline. Le marquage à la γ -actine tant qu'à lui a révélé la présence de l'actine dans tous les échantillons, même dans le puits témoin contenant du milieu de culture n'ayant jamais été mis en contact avec des cellules (Figure 9/C, p.56). Ce résultat n'était pas surprenant puisque l'actine a été détectée dans le FBS dans des études antérieures (von Blume, Duran et al. 2009). La présence d'actine dans notre puits témoin pourrait donc s'expliquer par la présence du FBS dans notre milieu de culture. Lorsque les cellules HeLa qui surexprimaient la protéine Tau humaine ont été incubées avec une solution à faible concentration de Triton X-100, une augmentation de la γ -actine dans le milieu de culture a été observée. Le marquage de l'actine semblait donc être plus sensible que celui à la tubuline et pourrait éventuellement être utilisé afin de comparer le taux de mort entre deux échantillons. Ainsi, si deux conditions ont la même quantité d'actine dans le milieu de culture, il serait possible de conclure que la mort cellulaire était équivalente dans ces deux puits. Par contre, après tous ces tests, il nous manquait toujours une technique de mesure de la mort cellulaire fiable.

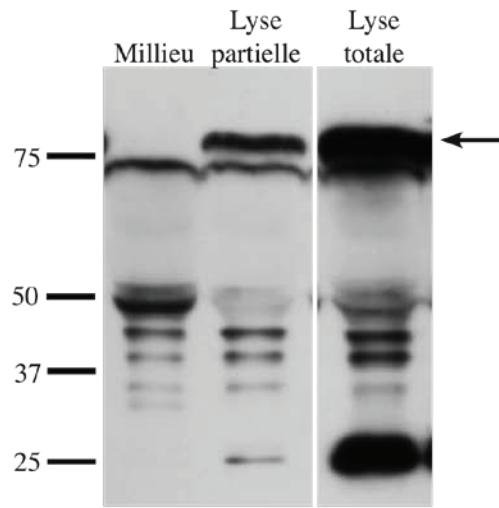
Une méthode utilisée par plusieurs laboratoires est la coloration au bleu trypan. Ce colorant peut pénétrer dans les cellules lorsque la membrane plasmique de celles-ci est endommagée (Figure 9/D, p.56). Le bleu trypan permet donc de détecter les cellules abimées ou mortes qui pourraient laisser échapper leur contenu intracellulaire et laisse les cellules en santé incolores. Nous avons donc mis des cellules HeLa en culture sur des lamelles. Lors de la récolte, ces lamelles ont été lavées, marquées au bleu trypan puis fixées. Les lamelles ont ensuite été observées au microscope et les cellules colorées et non-colorées ont été comptées dans 10 champs différents pour chaque condition. Ensuite, le pourcentage de mort cellulaire a été calculé grâce à la formule suivante:

$$\frac{\text{Nombre de cellules bleues}}{\text{Nombre de cellules totales}} \times 100$$

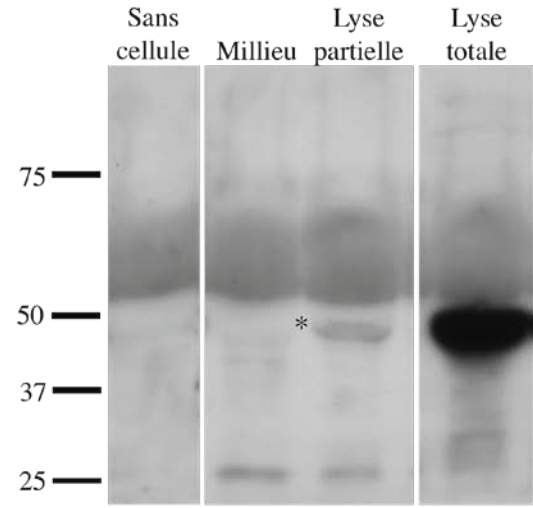
Figure 9. Tests de différentes méthodes de détection de la mort cellulaire.

Afin de confirmer que la protéine Tau observée dans le milieu de culture venait bel et bien de la sécrétion et non de la mort cellulaire, un test a été effectué dans lequel les cellules exprimant la GFP-Tau4R ont été lysées partiellement, grâce à du milieu contenant 0,01% de triton qui a été laissé sur les cellules pendant une quinzaine de secondes avant d'être récolté (A,B,C). **A)** Dans ces conditions, la protéine Tau pleine longueur était apparue dans le milieu des cellules ayant subi la lyse partielle mais était toujours absente du milieu récolté de cellules n'ayant pas subi de lyse (flèche). **B)** Nous avons par la suite testé l'apparition d'une protéine cytosolique non sécrétée, l' α -tubuline, dans le milieu extracellulaire. Cette protéine, détectée grâce à l'anticorps DM1A, a pu être détectée en grande quantité dans le lysat et en très faible quantité dans le milieu des cellules ayant subi la lyse partielle (*). Elle était par contre absente du milieu des cellules n'ayant pas subi de lyse partielle. **C)** Le marquage contre la γ -actine a révélé la présence de cette protéine dans le lysat ainsi que dans le milieu des cellules ayant subi une lyse partielle, bien qu'en moins grande quantité (flèche, 42 kDa). L'actine était aussi présente dans le milieu des cellules n'ayant pas subi de lyse et un faible marquage était présent dans le témoin contenant du milieu de culture n'ayant jamais été mis en contact avec les cellules (puits sans cellule). L'actine semblait donc présente dans tous les échantillons bien que de façon moindre dans le milieu des cellules sans lyse que dans le milieu de celles avec lyse partielle et totale. **D)** Le marquage au bleu trypan a été effectué sur des cellules HeLa cultivées sur des lamelles. L'observation de ces cellules au microscope a permis de détecter la présence de cellules mortes ou endommagées par leur coloration bleue (flèche) puisque le colorant ne pénétrait que dans les cellules ayant la membrane plasmique endommagée, laissant les cellules saines incolores. Barre d'échelle : 40 μ m.

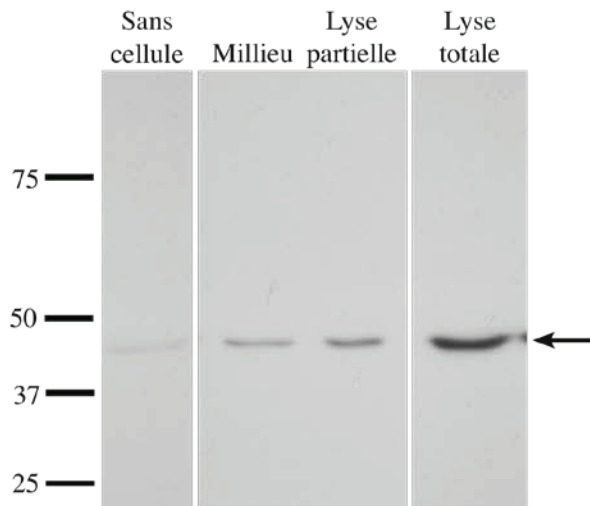
A)



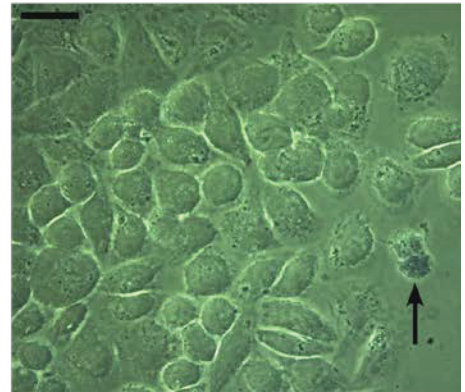
B)



C)



D)



Les comptes de cytotoxicité ainsi obtenus corrélaient bien avec l'apparence générale des cellules observées avant leur récolte. La limitation de cette technique par contre résidait dans le fait que les cellules HeLa, lorsqu'endommagées, pouvait décoller du pétri et se mettre à flotter dans le milieu de culture. Ces cellules endommagées ou mortes ne pouvait donc pas être comptées et le pourcentage de mort était ainsi sous-estimé. Nous nous devions donc de trouver une méthode de détection de la cytotoxicité plus complète et précise.

Plusieurs groupes de recherche qui examinent la sécrétion cellulaire utilisent la détection de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture comme technique de détection de la mort cellulaire suite à un traitement ou manipulation. La LDH est une enzyme cytosolique qui n'est pas sécrétée. La mesure de la quantité de LDH dans le milieu de culture pouvait donc être utilisée afin de déterminer l'intégrité de la membrane plasmique et de ce fait, la mort cellulaire. Nous avons ainsi commencé à utiliser le kit de détection de la LDH de Cayman. Ce kit nous a permis de détecter le niveau de la LDH dans le milieu (M), dans du milieu n'ayant jamais été en contact avec les cellules afin de mesurer le bruit de fond (BF), ainsi que dans les lysats (L). Nous avons ainsi obtenu un pourcentage de mort cellulaire grâce à la formule suivante :

$$\frac{(M - BF)}{(M-BF) + (L-BF)} \times 100$$

Le kit semblait bien fonctionner lors des premiers tests puisque la courbe standard que nous obtenions grâce aux standards LDH fourni par la compagnie avait une bonne corrélation et ressemblait à celle illustrée dans leur protocole. Par contre, lorsque nous avons testé le kit avec nos échantillons, il arrivait parfois que le bruit de fond était supérieur au niveau de la LDH détectée dans le milieu de culture. Cette donnée était plutôt étrange puisque le milieu utilisé pour calculer le bruit de fond avait la même composition que le milieu mis sur les cellules. Nous nous sommes par la suite rendus compte que le milieu de culture en contact avec les cellules pour 48 heures changeait de pH, ce qui pouvait potentiellement avoir un impact sur l'activité enzymatique de la LDH et donc sur sa détection par le kit. Nous avons donc par la suite tenté d'ajuster le pH du milieu de culture frais utilisé pour calculer le bruit de fond en fonction du pH du milieu de culture des cellules. Cette méthode nous a permis de constater que le pH influence énormément les

lectures de la LDH et qu'une différence de pH de 1 pouvait faire en sorte que le milieu de culture des cellules ait une valeur de LDH inférieure au bruit de fond. Pour le reste des expériences, nous avons donc dû ajuster le pH du milieu de culture frais à chaque culture cellulaire, puisque d'une fois à l'autre le pH du milieu pouvait varier. Grâce à cette méthode, les données de mesure de la LDH nous apparaissaient fiable, cette mesure corrélant bien avec l'apparence générale des cellules. De plus, les mesures de la LDH donnaient environ la même mesure de mort cellulaire que celle obtenue par marquage au bleu trypan. Nous avons donc décidé d'utiliser la détection de la LDH comme technique de détection de la mort cellulaire, combiné à l'une ou l'autre des différentes techniques discutées plus haut au besoin.

3.1.4. Tau emprunte une voie de sécrétion non-conventionnelle

Après avoir démontré la sécrétion de Tau et avoir trouvé une bonne méthode pour calculer la mort cellulaire, nous avons investigué le mode de sécrétion utilisé par la protéine Tau. Le premier type de sécrétion étudié a été la voie conventionnelle. Pour ce faire, nous avons utilisé la BFA afin de bloquer cette voie de sécrétion. Cette drogue perturbe la structure et les fonctions du golgi, empêchant ainsi la sécrétion cellulaire conventionnelle, une des fonctions de cette organelle. Le but était donc de vérifier si l'ajout de cette drogue au milieu de culture des cellules allait diminuer la quantité de Tau sécrétée comparativement à celle de cellules témoins ayant subi un traitement au DMSO seul, le véhicule de la BFA. Donc, 48 heures après la transfection, le milieu de culture des cellules a été changé pour du frais. Les cellules ont ensuite été traitées avec de la BFA à 5 µg/ml pendant 5 heures. L'immunobuvardage de ces échantillons a permis de démontrer que la BFA n'a pas eu d'effet sur la quantité de Tau dans le milieu de culture et donc, sur sa sécrétion (Figure 10/A, p.61). De plus, le test de la LDH a détecté 0% de mort cellulaire tant pour le témoin que pour le traitement ($n=4$). Nous avons aussi précédemment testé plusieurs concentrations et temps d'incubation différents avec la BFA afin de voir si une de ces conditions allait avoir un impact sur la sécrétion de Tau. Ainsi, nous avons testé la BFA sur nos cellules HeLa à 5 µg/ml et 10 µg/ml pendant 6 heures, à 5 µg/ml pendant 45 minutes et à 10 µg/ml pendant 24 heures. Dans tous les cas, aucune différence n'était observée entre le traitement à la BFA et le témoin (résultats non-présentés). Au final, avec

toutes les conditions testées, nous avons conclu que la BFA n'influçait pas la sécrétion de Tau dans les cellules HeLa et que par conséquent, elle devait emprunter une autre voie de sécrétion que la voie conventionnelle.

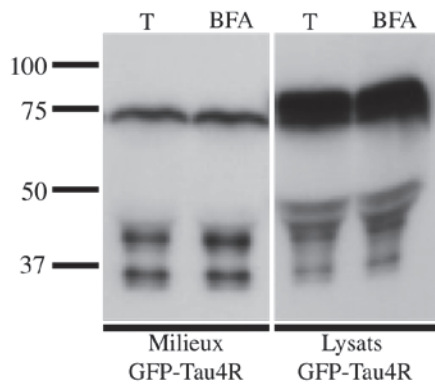
Par la suite, nous avons voulu vérifier si la sécrétion de Tau était un phénomène passif ou actif. Les voies de sécrétion dites conventionnelles et non-conventionnelles empruntent plusieurs voies qui utilisent une machinerie complexe qui requiert de l'énergie. Par contre, une protéine cytosolique peut se retrouver dans le milieu extracellulaire en traversant de façon passive la membrane plasmique. La sécrétion active est, de façon générale, un processus dépendant de la température alors que la diffusion passive n'est pas affectée par les changements de température. Un traitement largement utilisé afin d'inhiber de façon générale la sécrétion non passive est de diminuer la température des cellules (Saraste, Palade et al. 1986). Tout comme pour le traitement à la BFA, nous avons changé le milieu de culture des cellules 48 heures après la transfection et avons incubé les cellules dans du milieu frais. Les cellules témoins ont été incubées à 37°C alors que les cellules traitées ont été mises à 18°C ou 4°C pendant 6 heures. Le milieu et le lysat cellulaire ont ensuite été récoltés tel que précédemment décrit et mis sur gel pour analyse par immunobuvardage (Figure 10/B, p.61). La diminution de température a réduit de manière importante la quantité de Tau dans le milieu de culture (cytotoxicité de $0,4 \pm 0,5\%$, $3,2 \pm 1,6\%$ et $2,6 \pm 2,6\%$ pour le 37, 18 et 4°C respectivement tel que calculé par la mesure de la LDH, $n=2$). Ce résultat nous démontrait donc que la protéine Tau empruntait une voie de sécrétion active dépendante de la température. Par contre, aucune différence de sécrétion de la protéine Tau n'était observée entre 18°C et 4°C.

Par la suite, nous avons voulu vérifier que ce n'était pas le tag GFP qui provoquait ces effets puisque la sécrétion de celui-ci est dépendante de la température. Nous avons donc transfecté les cellules HeLa avec la Flag-Tau4R et avons procédé au traitement à la BFA et au test de diminution de température (figure 10/C et D, p.61). Tout comme pour la GFP-Tau4R, le traitement à la BFA n'a pas eu d'effet sur la sécrétion de Flag-Tau4R (cytotoxicité de $0 \pm 0\%$ pour le traitement et le témoin, $n=3$). La diminution de température tant qu'à elle a réduit la sécrétion de Flag-Tau4R et ce de façon équivalente pour le 18 et le 4°C, tout comme pour la GFP-Tau4R (cytotoxicité de $0 \pm 0\%$, $3,7 \pm 0,5\%$ et $3,3 \pm 0,9\%$ pour le 37, 18 et 4°C respectivement, $n=3$). En bref, puisque la protéine Tau empruntait

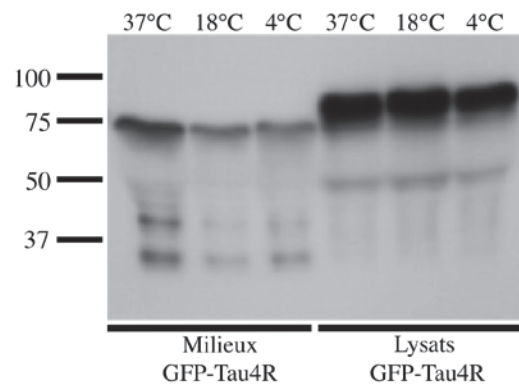
Figure 10. Mode de sécrétion de la protéine Tau par les cellules HeLa.

A) Les cellules HeLa transfectées avec GFP-Tau4R ont été traitées avec soit la BFA ou son véhicule, le DMSO, pendant 6 heures afin de bloquer la voie de sécrétion conventionnelle. La quantité de Tau sécrétée dans le milieu n'a pas changé suite au traitement à la BFA, indiquant de ce fait que la protéine Tau doit utiliser une voie de sécrétion non-conventionnelle pour être sécrétée. La mesure du LDH a révélé une mort cellulaire de $0 \pm 0\%$ pour les deux conditions ($n=4$), démontrant que la présence de Tau dans le milieu n'était pas due à la mort cellulaire. **B)** Afin de démontrer que la sécrétion de Tau se faisait par un mécanisme d'exocytose et non par simple diffusion à travers la membrane plasmique, les cellules HeLa surexprimant la GFP-Tau4R ont été incubées pendant 6 heures à basse température (18°C et 4°C). La quantité de Tau sécrétée a été comparée à un témoin ayant été laissé à 37°C . La diminution de température a réduit la quantité de Tau sécrétée, et ce de même façon pour 18 et 4°C (cytotoxicité de $0,4 \pm 0,5\%$, $3,2 \pm 1,6\%$ et $2,6 \pm 2,6\%$ pour le 37 , 18 et 4°C respectivement, $n=2$). **C)** Le traitement à la BFA a été répété sur les cellules HeLa surexprimant la Flag-Tau4R. Tout comme pour la GFP-Tau4R, ce traitement n'a pas influencé la quantité de Tau sécrétée (cytotoxicité de $0 \pm 0\%$ pour le traitement et son contrôle, $n=3$). **D)** Les tests de diminution de température ont été répétés sur les cellules HeLa surexprimant la Flag-Tau4R. Encore une fois, les résultats avec la Flag-Tau4R ont mimés ceux de la GFP-Tau4R, soit une diminution de sécrétion de Tau lorsque la température était diminuée (cytotoxicité de $0 \pm 0\%$, $3,7 \pm 0,5\%$ et $3,3 \pm 0,9\%$ pour le 37 , 18 et 4°C respectivement, $n = 3$). T, témoin; BFA, brefeldin A.

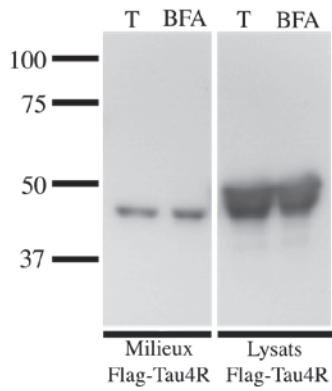
A)



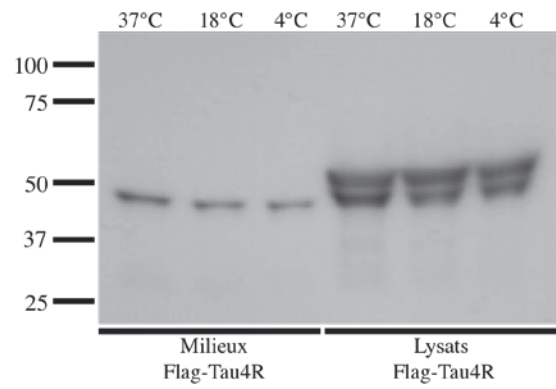
B)



C)



D)



une autre route que la voie passive et qu'elle ne passait pas par la voie conventionnelle, nous avons conclu qu'elle empruntait une ou plusieurs voies non-conventionnelles.

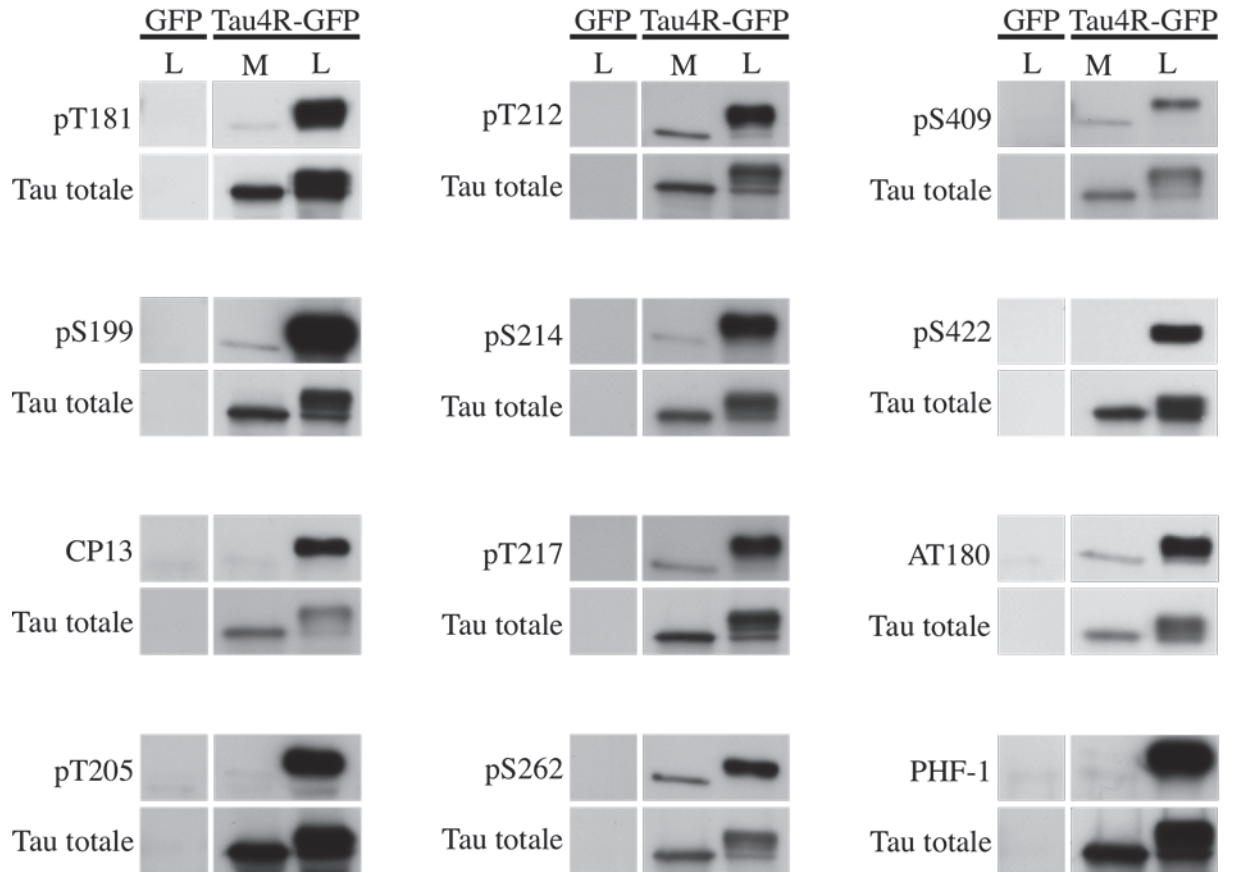
3.1.5. La protéine Tau sécrétée est déphosphorylée comparativement à la protéine Tau intracellulaire

Nous avons par la suite examiné l'état de phosphorylation de la protéine Tau sécrétée et l'avons comparé à celui de la protéine Tau intracellulaire non-sécrétée. Lorsque nous avons marqué nos échantillons avec divers anticorps phosphodépendants par immunobuvardage, aucun marquage n'apparaissait dans le milieu, bien que le lysat était marqué. Nous avons donc dû procéder à l'immunoprécipitation (IP) de nos échantillons pour concentrer la protéine Tau afin d'être en mesure de détecter la phosphorylation de cette dernière dans le milieu de culture. En effet, les anticorps phosphodépendants requièrent un niveau minimal de Tau pour la détecter par immunobuvardage. Donc, brièvement, nous avons utilisé des billes magnétiques couplées de façon covalente à des IgG anti-souris. Ces billes ont été incubées toute la nuit avec un mélange des anticorps Tau1, HT7 et CP13, lavées, puis incubées pendant deux heures avec 1,5 ml de milieu de culture ou lysat de cellules HeLa transfectées avec la GFP-Tau4R. Les billes ainsi couplées aux anticorps et à la protéine Tau ont finalement été bouillies afin de faire décrocher la protéine Tau des billes. Le surnageant bouilli a ensuite été séparé en deux afin d'être utilisé pour le marquage de deux anticorps dirigés contre Tau.

Nous avons ainsi étudié des sites de phosphorylation de la protéine Tau qui deviennent anormalement hyperphosphorylés dans la MA, soit la pT181, pS199, pS202 (détecté par l'anticorps CP13), pT205, pT212, pS214, pT217, pS262, pS409, pS422 ainsi que les épitopes phosphorylés reconnus par les anticorps AT180 (T231/S235) et PHF-1 (S396/S404)(Figure 11, p.64). Tous ces sites étaient phosphorylés dans le lysat des cellules, bien que le niveau de phosphorylation variait d'un site à l'autre. Seuls les sites reconnus par les anticorps CP13, pT205, pS422 et PHF-1 étaient soit absents du milieu ou présentaient un marquage non-spécifique alors que le marquage était bien visible dans les lysats correspondants. Les sites reconnus par ces anticorps étaient donc phosphorylés sur la protéine Tau intracellulaire mais non-phosphorylés sur la protéine extracellulaire. Pour les autres sites étudiés, nous avons observé une diminution évidente de

Figure 11. État de phosphorylation de la protéine Tau sécrétée comparativement à la protéine Tau intracellulaire.

Les milieux et lysats des cellules HeLa surexprimant la GFP-Tau4R et la GFP (témoin) ont été mis sur gel pour immunobuvardage et marqués avec différents anticorps phosphodépendants dirigés contre Tau ainsi que Tau12 afin de marquer la protéine Tau totale. Des 12 anticorps testés, seuls les sites reconnus par les anticorps CP13, pT205, pS422 et PHF-1 n'étaient pas phosphorylés dans le milieu de culture alors que la phosphorylation à ces sites était présente dans les lysats correspondants. Par la suite, pour la majorité des sites étudiés, l'observation de l'immunobuvardage nous a démontré une diminution évidente de Tau phosphorylée dans le milieu de culture comparativement à la protéine Tau intracellulaire. Les membranes exposées étaient représentatives de l'effet observé lors de toutes les expériences ($n=3$ sauf pour CP13 pour lequel un $n=4$ a été effectué). L, lysat; M, milieu.



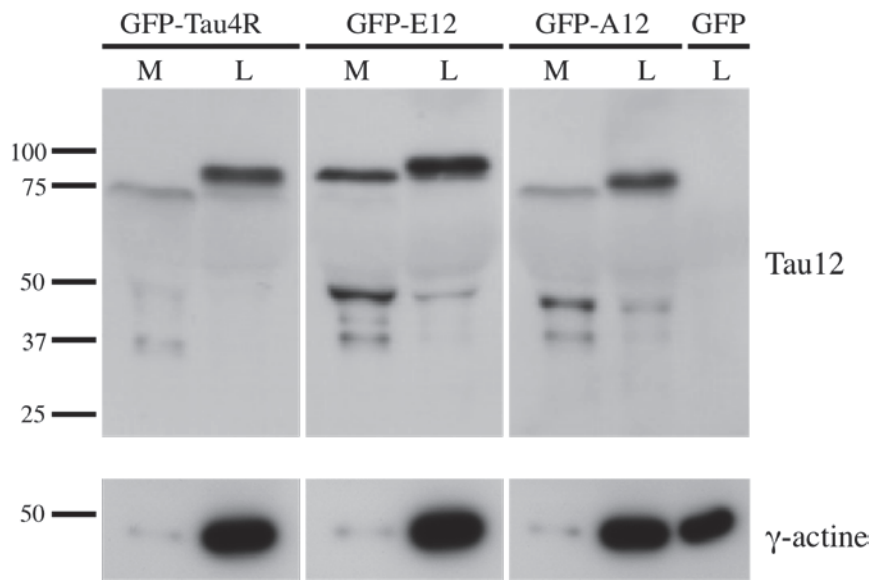
Tau phosphorylée dans le milieu de culture comparativement à la protéine Tau intracellulaire. En effet, pour un niveau équivalent de Tau totale et de Tau phosphorylée dans le lysat cellulaire, le milieu de culture présentait une quantité de Tau phosphorylée beaucoup plus faible que la quantité de Tau totale. Ces observations nous ont donc permis de conclure que la protéine Tau sécrétée était globalement déphosphorylée comparativement à la protéine Tau intracellulaire aux sites étudiés. Pour chaque échantillon, la cytotoxicité était calculée en mesurant la LDH et cette mesure nous a permis de conclure que la mort n'influait pas la phosphorylation de la protéine Tau sécrétée. Au final, ces résultats ont permis de démontrer que la protéine Tau extracellulaire était déphosphorylée comparativement à l'intracellulaire.

3.1.6. L'état de phosphorylation de Tau influence sa sécrétion

Après avoir démontré que la protéine Tau sécrétée était déphosphorylée comparativement à la protéine Tau intracellulaire, on s'était demandé si une Tau hypophosphorylée serait davantage sécrétée qu'une Tau hyperphosphorylée. Nous avons donc transfecté les cellules HeLa avec la GFP-Tau4R ou avec la Tau4R ayant subi 12 mutations en glutamate (E12) ou en alanine (A12) afin de mimer ou empêcher la phosphorylation à ces sites, respectivement. Les 12 sites mutés étaient les suivants: S199, S202, T205, S214, T231, S235, S262, S356, S396, S400, S404 et S409. Ces sites ont été choisis à cause de leur taux élevé de phosphorylation dans la pathologie. Par immunobuvardage, nous avons ensuite marqué la protéine Tau totale avec l'anticorps Tau12 et nous avons fait parallèlement un marquage contre la γ -actine pour vérifier que les taux de mort cellulaire calculés par la mesure de la LDH n'influaient pas la quantité de protéines intracellulaires dans le milieu de culture (Figure 12, p.67). Le marquage à la Tau12 a permis de révéler que toutes ces formes de Tau étaient sécrétées dans le milieu extracellulaire. On a d'abord observé que le mutant GFP-E12 avait un plus haut poids moléculaire que la GFP-Tau4R, phénomène dû à la charge négative et au changement conformationnel introduits par les acides aminés glutamate qui miment la phosphorylation (Haase, Stieler et al. 2004). Pour vérifier le niveau de Tau sécrétée par les cellules lorsque transfectées avec la protéine Tau de type sauvage et ses mutants, nous avons calculé le ratio

Figure 12. Effet de la phosphorylation de Tau sur sa sécrétion.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec de la GFP-Tau4R ainsi qu'avec de la Tau4R contenant 12 sites mutés en glutamate ou en alanine, la GFP-E12 et GFP-A12 respectivement. Les mutations en glutamate permettent de mimer la phosphorylation de Tau à ces sites alors que les mutations en alanine empêchent ces sites d'être phosphorylés. En calculant le ratio de la quantité de Tau dans le milieu sur la quantité dans le lysat, estimé par densitométrie, la quantité de Tau sécrétée a pu être évaluée. Ces calculs nous ont permis de constater que la GFP-E12 était $2,51 \pm 0,55$ fois plus sécrétée que la GFP-Tau4R ($p = 0,012$, $n=4$) et $1,94 \pm 0,45$ fois plus sécrétée que la GFP-A12 ($p = 0,026$, $n=4$) (cytotoxicité de $5,6 \pm 3,7\%$, $5,7 \pm 2,7\%$ et $4,0 \pm 3,8\%$ pour la GFP-E12, GFP-Tau4R et GFP-A12 respectivement).



de la quantité de Tau dans le milieu sur la quantité de Tau dans le lysat. En comparant les ratios, nous avons constaté que la GFP-E12 était $2,51 \pm 0,55$ fois plus sécrétée que la GFP-Tau4R ($p = 0,012$, $n=4$) et $1,94 \pm 0,45$ fois plus sécrétée que la GFP-A12 ($p = 0,026$, $n=4$) (cytotoxicité de $5,6 \pm 3,7\%$, $5,7 \pm 2,7\%$ et $4,0 \pm 3,8\%$ pour la GFP-E12, GFP-Tau4R et GFP-A12 respectivement). De plus, la cytotoxicité étant équivalente entre la Tau4R et la E12, cela prouvait que la différence de sécrétion était bel et bien due à la différence de phosphorylation entre ces deux protéines. Le marquage à l'actine tant qu'à lui nous a permis de constater qu'il n'y avait pas de différence au niveau de protéines intracellulaires se trouvant dans le milieu prouvant davantage que la différence entre Tau4R et E12 dans le milieu de culture ne provenait pas de la mort cellulaire. Étonnamment, ces résultats nous ont donc démontré que la protéine Tau hyperphosphorylée était davantage sécrétée que la protéine Tau hypophosphorylée.

3.1.7. La protéine Tau sécrétée est clivée en C-terminal

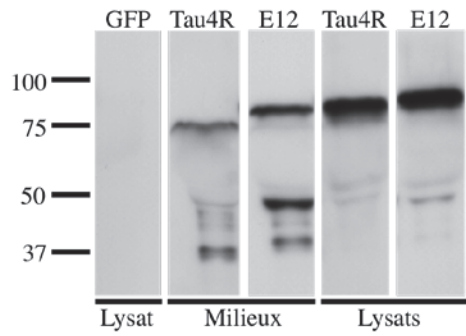
Nos résultats ont montré que la protéine Tau sécrétée était toujours clivée, la bande de Tau pleine longueur n'apparaissant jamais dans le milieu. Nous avons donc voulu savoir quel segment de la protéine Tau était ainsi clivé. Pour ce faire, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre différentes régions de Tau. Ainsi, les anticorps dirigés contre la GFP et l'anticorps Tau12, dirigé contre les a.a. 9 à 18, ont été utilisés afin de vérifier la présence de la portion N-terminale de la protéine Tau sécrétée. L'anticorps K9JA, reconnaissant les a.a. 243 à 441 de Tau, a permis de vérifier l'intégrité du domaine de liaison aux microtubules (MTBD). Finalement, l'anticorps Tau46, dirigé contre les a.a. 428 à 441 (Carmel, Mager et al. 1996), a été utilisé pour détecter la portion C-terminale de Tau. Nous avons de plus fait ces expériences sur le mutant E12 afin de vérifier si celui-ci avait un motif de clivage différent de celui de la Tau4R non-mutée.

Nous avons d'abord investigué la portion N-terminale de la protéine, reconnu par l'anticorps Tau12 ou par la détection du tag GFP de notre Tau qui était situé du côté N-terminal de la protéine (Figure 13/A,B, p.70). Le marquage Tau12 était présent à la fois dans le milieu de culture et le lysat de GFP-Tau4R et GFP-E12 (cytotoxicité de $5,4 \pm 2,5\%$ et $4,3 \pm 3,4\%$ pour GFP-Tau4R et GFP-E12 respectivement, $n=3$). Par la suite, le marquage

Figure 13. Marquage du N- et C-terminal de Tau ainsi que du MTBD dans des cellules HeLa transfectées avec la GFP-Tau4R et la GFP-E12.

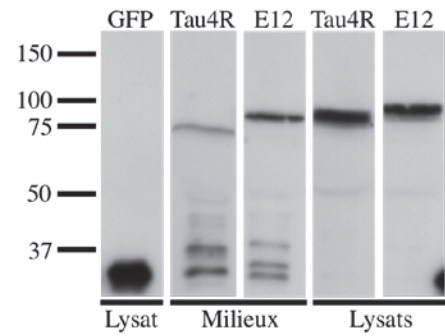
A) L'anticorps Tau12 marque le N-terminal de Tau aux a.a. 9 à 18. Ce marquage a permis de démontrer que la GFP-Tau4R ainsi que la GFP-E12 contenaient toutes deux cette portion de la protéine. **B)** Le marquage contre la GFP, tag situé en N-terminal de Tau, a permis de corroborer la présence de cette portion de la protéine. **C)** Les échantillons ont été marqués avec l'anticorps K9JA, reconnaissant les a.a. 243 à 441 de Tau, englobant les répétitions du MTBD. Ce marquage a révélé la présence de cette portion de Tau à la fois pour la GFP-Tau4R et son mutant. **D)** Finalement, la présence de la portion C-terminale a été investiguée grâce à l'anticorps Tau46, dirigé contre les a.a. 428 à 441. Ce marquage a révélé l'absence de la portion C-terminale de Tau pour toutes les bandes de Tau clivée. Les bandes à 50 et 100 kDa sont non-spécifiques, tel que révélées grâce aux cellules témoins transfectées avec la GFP seule.

A)



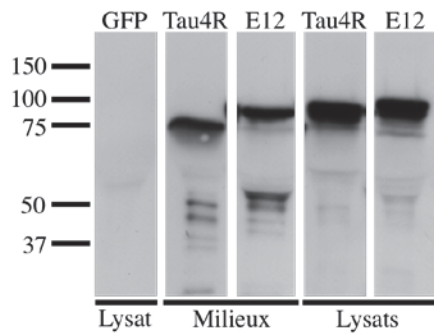
Tau12

B)



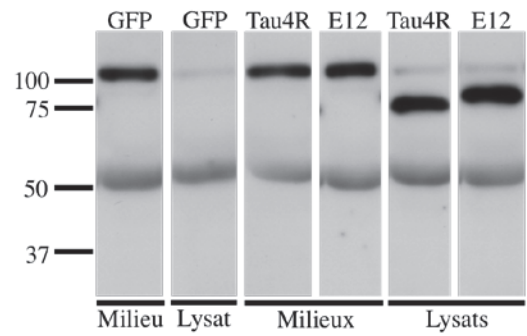
GFP

C)



K9JA

D)



Tau46

contre la GFP a démontré que le tag était toujours présent dans le milieu de culture pour ces deux formes de la protéine (cytotoxicité de $5,4 \pm 2,5\%$ et $4,3 \pm 3,4\%$ pour GFP-Tau4R et GFP-E12 respectivement, $n=3$). Ces deux résultats ont donc démontré que la partie N-terminale de la protéine Tau sécrétée était intacte.

Par la suite nous avons marqué les échantillons avec l'anticorps K9JA (Figure 13/C, p.70). Encore une fois, la bande principale de la GFP-Tau4R et la GFP-E12 était marquée par cet anticorps, indiquant que la portion du MTBD était présente (cytotoxicité de $5,4 \pm 2,5\%$ et $4,3 \pm 3,4\%$ pour GFP-Tau4R et GFP-E12 respectivement, $n=3$). Finalement, la portion C-terminale de la protéine a été marquée avec l'anticorps Tau46 (Figure 13/D, p.70). La bande de Tau pleine longueur était immunoréactive pour cet anticorps dans le lysat alors que la bande clivée à 75 kDa présente dans le lysat et le milieu n'était pas marquée par cet anticorps et ce pour Tau4R et E12 (cytotoxicité de $5,4 \pm 2,5\%$ et $4,3 \pm 3,4\%$ pour GFP-Tau4R et GFP-E12 respectivement, $n=3$). Cela démontrait donc que la protéine Tau sécrétée par les cellules HeLa était clivée en C-terminal.

3.2. La protéine Tau est sécrétée par les cellules PC12

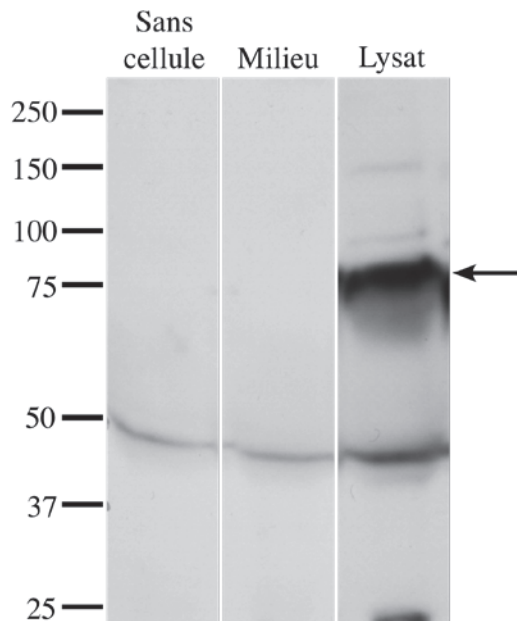
3.2.1. Expression de la GFP-Tau4R dans les cellules PC12 stablement transfectées

Afin de prouver que la sécrétion de la protéine Tau par les cellules HeLa n'était pas spécifique à ce type cellulaire, nous avons testé la sécrétion de cette protéine par les cellules PC12, une lignée cellulaire du phéochromocytome de rat. Cette lignée est globalement considérée comme un modèle de choix pour l'étude des mécanismes de l'exocytose, de la biogénèse d'organelles sécrétoires et du trafic des protéines sécrétoires entre autre (Taupenot 2007). Les cellules PC12 utilisées étaient stablement transfectées avec la GFP-Tau4R. La récolte des milieux et lysats se faisait selon le protocole décrit pour les cellules HeLa mais 3 jours après la mise en culture des cellules. Les tests initiaux réalisés avec cette lignée cellulaire nous ont permis de constater que la protéine Tau était bien exprimée, tel que révélé dans le lysat cellulaire, bien que de façon moindre que pour les HeLa, mais que Tau n'apparaissait pas dans le milieu de culture (Figure 14/A, p.73). Nous avons donc dû immunoprécipiter la protéine Tau du milieu de culture pour pouvoir la détecter par

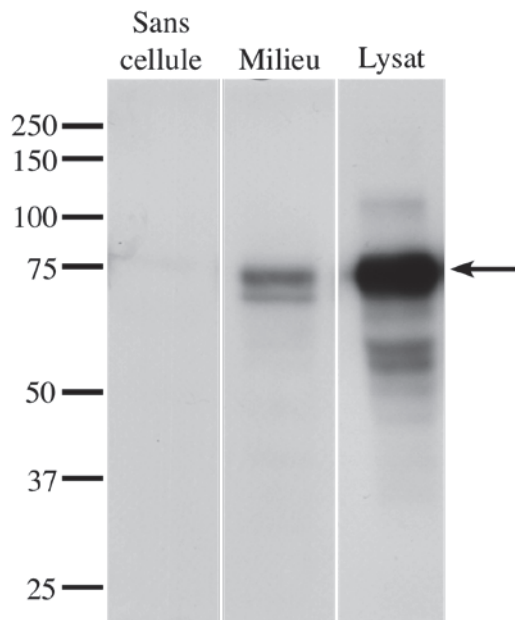
Figure 14. Sécrétion de Tau par des cellules PC12 stablement transfectées avec la GFP-Tau4R.

A) Les cellules PC12 stablement transfectées avec la GFP-Tau4R ont été récoltées et lysées 72 heures après leur mise en culture. L'anticorps HT7 a été utilisé afin de marquer la protéine Tau par immunobuvardage. Le lysat démontrait la présence de la GFP-Tau4R à 75 kDa comme attendu (flèche), mais aucune Tau n'était présente dans le milieu de culture. Puisque la bande à 50 kDa apparaissait dans le puits témoin ne contenant que du milieu de culture frais (sans cellule), on a conclu que celle-ci était non-spécifique. **B)** Le milieu et le lysat ont été immunoprécipités afin de concentrer la protéine Tau. Celle-ci a pu être détectée grâce à l'anticorps de abcam dans le lysat et le milieu extracellulaire (flèche) (cytotoxicité de 0%). Ces résultats démontraient donc que la GFP-Tau4R était sécrétée par les PC12.

A)



B)



immunobuvardage. La protéine Tau présente dans le lysat a également été immunoprécipitée afin de pouvoir comparer la quantité de Tau intracellulaire et extracellulaire. La méthode utilisée pour l'IP de Tau était la même que celle décrite dans la section 3.1.5. Nous avons ensuite révélé la protéine Tau grâce à l'anticorps de AbCam par immunobuvardage (Figure 14/B, p.73). Nous avons donc constaté que les cellules exprimaient bel et bien la protéine Tau et que l'anticorps ne détectait pas de bandes non-spécifiques dans un témoin constitué de milieu de culture frais ayant subi une IP dans les mêmes conditions que le lysat. Tout comme pour les cellules HeLa, nous avons observé la bande de Tau pleine longueur à 75 kDa dans le lysat ainsi que plusieurs bandes de Tau clivée sous cette bande principale. Les bandes de clivage principales se trouvaient entre 50 et 75 kDa, avec deux bandes un peu plus pâles à 50 kDa et en dessous. Le motif de clivage semblait donc différent de celui observé dans les HeLa. Cette différence était aussi observable dans le milieu de culture. Dans ce modèle, la protéine Tau pleine longueur se retrouvait dans le milieu de culture ainsi qu'une bande de clivage se trouvant tout juste sous la pleine longueur. Dans les HeLa, seulement cette dernière était présente dans le milieu de culture. De plus, la mort cellulaire ne pouvait expliquer la présence de la bande pleine longueur dans le milieu puisque la mesure de la LDH nous donnait 0% de mort. Au final, bien que le motif de clivage était différent des cellules HeLa, ce qui pouvait s'expliquer par la différence du type cellulaire, ces résultats nous ont démontré que les PC12 avaient la capacité de sécréter la protéine GFP-Tau4R.

3.2.2. Investigation des voies de sécrétion empruntées par Tau

Nous avons par la suite exploré différentes voies de sécrétion afin de vérifier par quels mécanismes Tau pouvait être sécrétée. Plusieurs voies non-conventionnelles de sécrétion sont stimulées par une augmentation de calcium cytosolique (Mills, Urbe et al. 2001; Savina, Furlan et al. 2003; Barclay, Morgan et al. 2005). Pour vérifier si un changement de la concentration intracellulaire de calcium influençait la sécrétion de la protéine Tau, nous avons donc traité nos cellules avec 100 nM de thapsigargine, une drogue qui augmente la concentration de calcium intracellulaire, pendant 6 heures (Figure 15/A, p.78). Il est important de souligner que pour chaque traitement effectué, le milieu de culture était toujours changé pour du frais avant l'administration de la drogue ou de son véhicule

afin de se débarrasser de la protéine Tau déjà présente dans le milieu. Nous avons donc observé par immunobuvardage que le traitement à la thapsigargine a augmenté de façon importante la quantité de Tau sécrétée comparativement au témoin, contenant le véhicule de la drogue, du DMSO, pendant 6 heures (0% de mort cellulaire pour le témoin et le traitement, $n=1$). Ces données démontraient donc que la sécrétion de la protéine Tau par les PC12 était augmentée en présence d'une plus grande concentration de calcium cytosolique.

Ensuite, nous nous sommes penchés sur la possibilité que Tau pourrait être sécrétée par l'induction d'autophagie. En effet, des études récentes ont démontré que les vacuoles autophagiques (VAs) ou autophagosomes sont impliqués dans la sécrétion non-conventionnelle (Duran, Anjard et al. 2010; Manjithaya, Anjard et al. 2010). Dans plusieurs maladies neurodégénératives, dont la MA, l'accumulation de VAs a été notée. La cause de cette accumulation a longtemps été considérée comme le reflet d'un phénomène d'induction de l'autophagie dans les neurones (Boellaard, Schlote et al. 1989; Anglade, Vyas et al. 1997; Kegel, Kim et al. 2000; Ko, Milenkovic et al. 2005; Nixon, Wegiel et al. 2005). Cependant, une accumulation de VAs pourrait également signifier que leur élimination est diminuée. En effet, les VAs sont éliminées en fusionnant avec les lysosomes et donc le mal-fonctionnement des lysosomes peut résulter en une accumulation des VAs (Kiselyov, Jennigs et al. 2007; Settembre, Fraldi et al. 2008). Une étude du Dr Nixon a démontré que l'accumulation des autophagosomes observée dans la MA proviendrait probablement d'un problème d'élimination des VAs plutôt que d'une forte induction de l'autophagie seule (Boland, Kumar et al. 2008). Dans la présente étude, nous avons donc voulu vérifier si la stimulation de l'autophagie, l'inhibition de la fonction lysosomale ou la combinaison de ces deux phénomènes, avaient un impact sur la sécrétion de la protéine Tau. L'autophagie a été induite par une privation en nutriments en diminuant le pourcentage de sérum dans le milieu de culture (Klionsky, Abeliovich et al. 2008) ou par un traitement à la rapamycine, une drogue supprimant l'activité de la kinase mTOR («*mammalian target of rapamycin*») (Blommaert, Luiken et al. 1995; Noda and Ohsumi 1998; Kamada, Funakoshi et al. 2000; Klionsky, Meijer et al. 2005)(Figure 15/B-C , p.78). Pour la privation de nutriments, la quantité de sérum a été diminuée de 5 fois dans le milieu de culture puis nous avons incubé les cellules dans ce milieu pendant 6 heures. Pour les cellules témoins, le milieu de culture a simplement été changé pour du nouveau contenant la concentration normale de sérum. On a donc pu observer par immunobuvardage que ce traitement n'a pas changé le niveau de

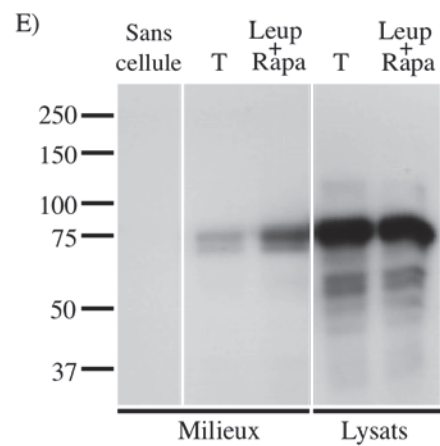
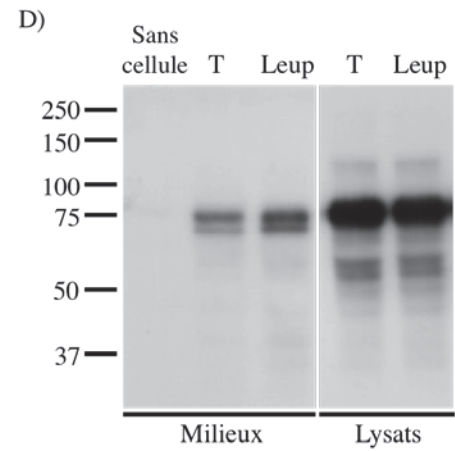
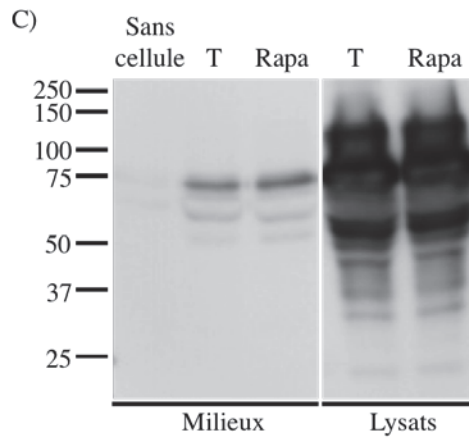
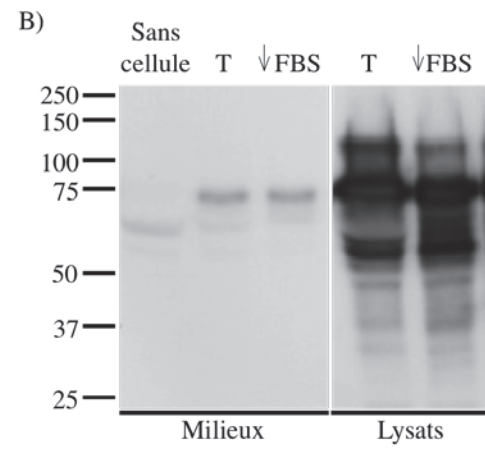
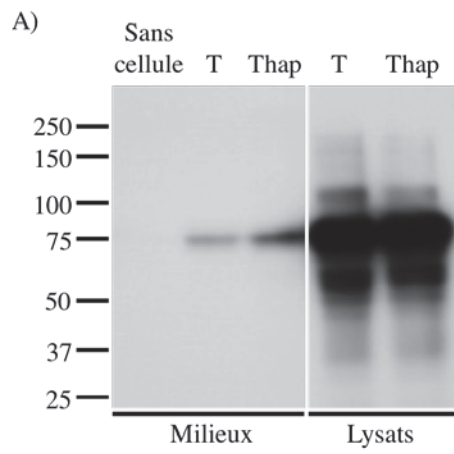
sécrétion de la protéine Tau (0% de mort pour le traitement et le témoin, $n=1$). Par la suite, nous avons traité les cellules avec 10 μM de rapamycine ou avec un volume équivalent de DMSO, son véhicule, pendant 6 heures. On a donc pu voir par immunobuvardage que la rapamycine n'a pas induit d'augmentation de Tau dans le milieu de culture (0% de mort cellulaire pour témoin et traitement, $n=1$). Ces deux tests nous ont donc permis de constater que l'induction de l'autophagie dans les cellules PC12 exprimant la GFP-Tau4R n'a pas eu d'effet sur la sécrétion de cette dernière.

Nous avons ensuite testé si un mal-fonctionnement des lysosomes pourrait conduire à une augmentation de la sécrétion de la protéine Tau. Pour ce faire, les PC12 ont été traitées avec 100 μM de leupeptine, un inhibiteur des protéases cystéines et sérines et donc un perturbateur de l'activité lysosomale, ou avec de l'eau, son véhicule, pour 24 heures (Figure 15/D, p.78). La leupeptine a augmenté la quantité de Tau dans le milieu de culture (0% de mort cellulaire pour témoin et traitement, $n = 1$). Ce résultat suggérait donc que la sécrétion de la protéine Tau était augmentée lorsqu'il y avait un mal-fonctionnement au niveau des lysosomes.

L'augmentation de la sécrétion suite au traitement à la leupeptine pouvait provenir d'un effet d'accumulation des autophagosomes mais pouvait aussi être simplement imputable à une diminution de dégradation de la protéine Tau et donc à une augmentation de sa sécrétion via d'autres voies. Pour vérifier cela, nous avons induit l'autophagie avec la rapamycine et inhibé la dégradation des autophagosomes avec la leupeptine. Si la sécrétion de Tau était plus importante avec la combinaison de ces 2 traitements qu'avec celui à la leupeptine seule, cela signifierait que la sécrétion de Tau se faisait par le biais de l'accumulation des autophagosomes. De plus, comme il était possible que dans la MA il y ait une augmentation de l'autophagie couplée à une diminution de l'activité lysosomale, nous avons ainsi recréé cette condition en culture. Pour ce faire, les cellules ont été traitées avec 10 μM de rapamycine et 100 μM de leupeptine simultanément (Figure 15/E, p.78). La combinaison de ces deux traitements a augmenté de façon très importante la quantité de Tau sécrétée (0% de mort cellulaire pour témoin et traitement, $n = 1$). Ces résultats suggéraient donc qu'un dysfonctionnement au niveau des lysosomes causait une augmentation de la sécrétion de Tau, mais qu'une combinaison de ce dysfonctionnement avec une induction de l'autophagie pouvait augmenter cette sécrétion de façon encore plus importante.

Figure 15. Effet de divers traitements sur la sécrétion de Tau par des cellules PC12 stablement transfectées avec GFP-Tau4R.

A) Les cellules PC12 stablement transfectées avec la GFP-Tau4R ont été traitées avec la thapsigargine. Cette drogue augmente la concentration de calcium cytosolique. Ce traitement a stimulé la sécrétion de la protéine Tau comparativement à son témoin, le DMSO (cytotoxicité de 0% pour le traitement et son témoin, $n=1$). **B)** Les cellules ont été soumises à une diminution de sérum afin d'induire l'autophagie. Les cellules traitées ont donc été incubées avec 5 fois moins de sérum que les cellules témoins. Ce traitement n'a pas eu d'effet sur la sécrétion de Tau (cytotoxicité de 0% pour le traitement et son témoin, $n=1$). **C)** Les cellules ont été traitées avec la rapamycine et son véhicule, le DMSO. La rapamycine est un inducteur d'autophagie via l'inhibition de mTOR. Ce traitement n'a pas eu d'impact sur la sécrétion de Tau (cytotoxicité de 0% pour le traitement et son témoin, $n=1$). **D)** Les PC12 ont été traitées avec de la leupeptine pendant 24 heures, un inhibiteur de la protéolyse dans les autolysosomes. Les cellules témoins ont été traitées avec de l'eau. Ce traitement a favorisé la sécrétion de la protéine Tau (cytotoxicité de 0% pour le traitement et son témoin, $n=1$). **E)** Les cellules ont été traitées avec une combinaison de leupeptine et de rapamycine pendant 24 heures. Ce traitement combiné a eu pour effet d'augmenter considérablement la quantité de Tau dans le milieu de culture. La mort cellulaire était de 0% pour le traitement et le témoin, contenant de l'eau et du DMSO ($n=1$). Il est important de souligner qu'avant chaque traitement, le milieu de culture des cellules était changé pour du frais afin d'enlever la protéine Tau ayant pu être sécrétée avant l'administration du traitement. De plus, pour les figures D et E, les lysats ont été pris à une exposition différente des milieux afin de faciliter l'analyse visuelle des résultats. T, témoin; Thap, thapsigargine; Rapa, rapamycine; Leup, leupeptine.



3.3. Sécrétion de la protéine Tau endogène par des neurones corticaux de souris de type sauvage

Après avoir obtenu cette série de résultats intéressants avec les cellules PC12, nous avons tenté de reproduire ces expériences dans un autre système cellulaire, les cultures primaires de neurones corticaux isolés à partir d'embryons de souris de type sauvage. Ces neurones sont affectés dans la MA. Dans ce modèle expérimental, nous avons voulu vérifier si la protéine Tau endogène pouvait être sécrétée suite aux traitements décrits pour les cellules PC12. Les traitements ont été effectués entre les jours 10 et 13 après la mise en culture des neurones lorsque ceux-ci présentaient une arborisation dendritique et un axone pleinement différencié. Les méthodes utilisées pour les traitements, récoltes, lyses, IP et immunobuvardages étaient les mêmes que pour les PC12. Nous avons donc d'abord traité les neurones avec 100 nM de thapsigargine ou avec le véhicule approprié (Figure 16/A, p.83). Suite à l'immunobuvardage, nous avons tout d'abord pu observer que nous détectons la protéine Tau endogène des neurones, se trouvant à 50 kDa, dans le lysat ainsi que dans le milieu. La mort cellulaire étant de 4,9% et 1,3% pour le témoin et la thapsigargine respectivement. Cette présence de Tau dans le milieu de culture ne pouvait donc pas s'expliquer par un phénomène de mort cellulaire. Il était donc très intéressant de voir que la protéine Tau pouvait être sécrétée, et ce même dans un modèle de souris de type sauvage dans lequel la protéine Tau n'était pas surexprimée. Par contre, l'élévation de calcium intracellulaire par la thapsigargine n'a pas eu d'effet sur la sécrétion de Tau dans ce modèle ($n=1$), contrairement à ce qui avait été observé chez les PC12.

Nous avons par la suite voulu tester l'effet d'une augmentation de calcium intracellulaire sur la sécrétion de Tau par les neurones avec un autre traitement que la thapsigargine. Pour ce faire, nous avons utilisé une concentration de potassium permettant la dépolarisation des cellules, ce qui provoque une augmentation du calcium intracellulaire. Brièvement, les cellules ont été lavées deux fois avec la solution témoin (K5, recette p,49 de la section matériel et méthode) puis les cellules témoins ont été incubées avec du K5 alors que les cellules traitées avec du K50, contenant 45 mM plus de potassium que la solution témoin, pendant 3 heures à 37°C (Faure, Lachenal et al. 2006). Le milieu a ensuite été récolté et les cellules lysées, afin de procéder à l'IP avec les échantillons puis à l'immunobuvardage. Ce dernier a permis de révéler que la dépolarisation induite par le K50

a augmenté la sécrétion de la protéine Tau endogène par les neurones corticaux (Figure 16/B, p.83) (cytotoxicité de 1,1% et 0% pour le témoin et le traitement respectivement, $n = 1$).

Ensuite, nous avons vérifié l'effet de l'induction de l'autophagie et de l'inhibition de l'activité lysosomale sur la sécrétion de Tau dans ce modèle. Afin de soumettre les neurones à une privation en nutriments et ainsi induire l'autophagie, nous avons diminué la quantité du supplément B27 contenu dans notre milieu de culture pendant 6 heures (Figure 16/C, p.83), le B27 remplaçant le sérum pour ces cellules. Tout comme pour les PC12, le milieu traitement contenait 5 fois moins de B27 que le milieu témoin. Ce traitement a eu pour effet d'augmenter la quantité de Tau dans le milieu (0% de mort cellulaire pour témoin et traitement, $n = 1$). Pour confirmer que l'induction de l'autophagie pouvait conduire à une augmentation de la sécrétion de Tau, les neurones ont été traités avec 15 nM de rapamycine ou de son véhicule pendant 6 heures. Suite à ce traitement, très peu de Tau n'a été détectée dans le milieu de culture et la bande de Tau dans le milieu des cellules témoins semblait être équivalente à celle du milieu des cellules traitées (0,6% et 1,3% de mort cellulaire pour le témoin et le traitement respectivement, $n = 1$). Ces derniers résultats remettaient en question les effets positifs de l'induction de l'autophagie sur la sécrétion de Tau observés par la privation de nutriments.

Nous avons par la suite testé l'effet de l'inhibition de l'activité des lysosomes sur la sécrétion de Tau en traitant les neurones avec la leupeptine. Les neurones ont été traités avec 40 μ M de leupeptine pendant 24 heures (Figure 16/E, p.83). Le traitement a provoqué une augmentation impressionnante de Tau dans le milieu de culture. La cytotoxicité était de 3,4% pour le témoin et 10,3% pour le traitement ($n = 1$). Une partie de la protéine Tau du milieu par le traitement pourrait donc s'expliquer par une hausse d'un peu plus du triple de la mort cellulaire. Par contre, il y avait beaucoup plus de trois fois la quantité de Tau dans le milieu traité comparativement au témoin. Ces résultats semblaient donc suggérer un effet d'induction de la sécrétion de la protéine Tau endogène par la leupeptine mais cette hypothèse ne pourra être vérifiée qu'après plusieurs tests et en diminuant la quantité de mort des neurones traités.

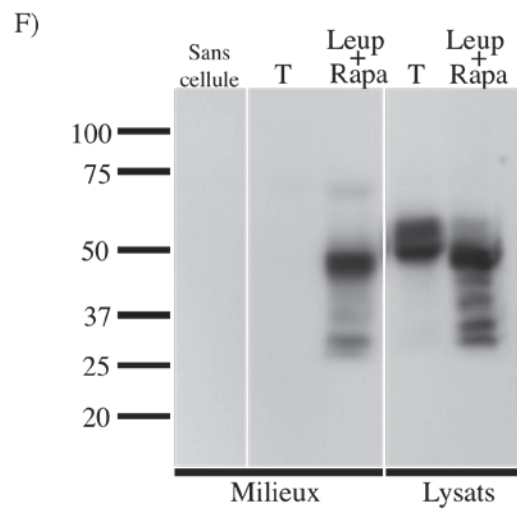
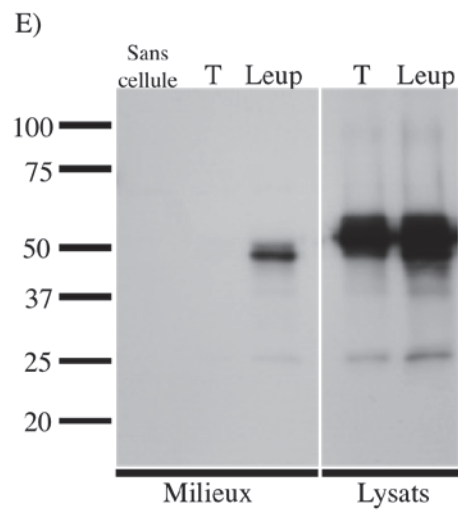
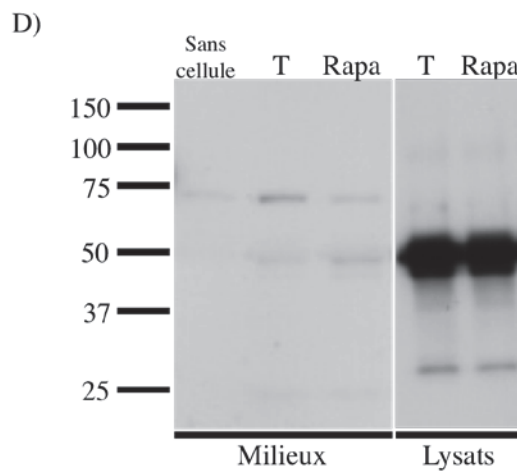
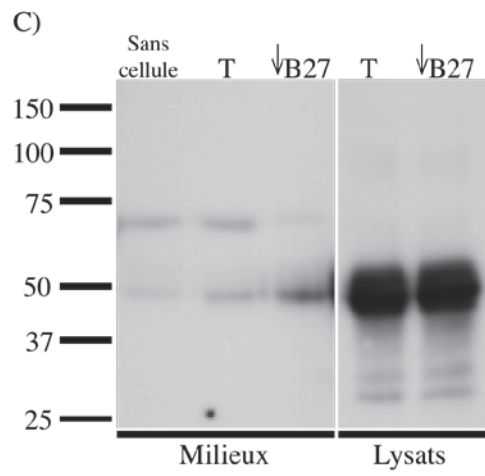
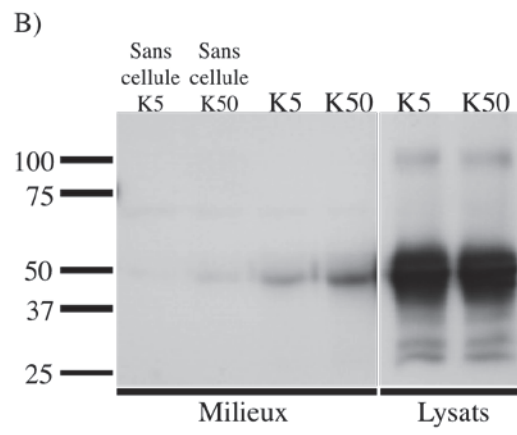
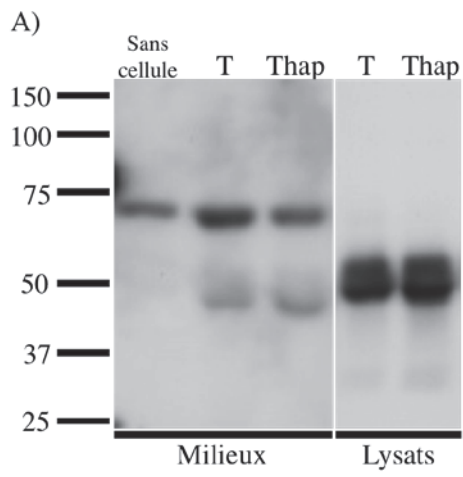
Par la suite, la combinaison de leupeptine et de rapamycine a été testée sur les neurones (Figure 16/F, p.83). La leupeptine a cette fois été utilisée à 20 μ M et la rapamycine toujours à 15 nM pendant 24 heures. L'immunobuvardage a révélé encore une

fois une augmentation faramineuse de Tau dans le milieu de culture des neurones traités. Par contre, la mort cellulaire était de 1,8% pour le témoin et de 27% pour le traitement ($n=1$). Il devenait par conséquent impossible de déterminer si la protéine Tau extracellulaire venait entièrement de sa sécrétion induite par le traitement ou si une portion avait été libérée dans le milieu de culture suite à la mort des neurones. Les tests devront donc être répétés dans des conditions où il y aura un faible taux de mort neuronale afin de pouvoir conclure de façon définitive que l'induction de l'autophagie combinée à une inhibition de l'activité lysosomale augmente la sécrétion de Tau.

Au final, les résultats obtenus avec les neurones de souris de type sauvage concordent avec ceux obtenus des PC12, bien que de hauts pourcentages de mort rendaient parfois difficile l'analyse de l'effet de certaines drogues sur les neurones.

Figure 16. Effets de divers traitements sur la sécrétion de Tau par des neurones corticaux de souris de type sauvage.

Les milieux et lysats des neurones ont été immunoprécipités avant d'être analysés par immunobuvardage. Les neurones utilisés n'avaient pas été transfectés. C'est donc la Tau endogène, se trouvant à 50 kDa, qui a été analysée. La mort cellulaire a été estimée par mesure de la LDH. **A)** Le traitement à la thapsigargine n'a pas eu d'effet sur la sécrétion de Tau (cytotoxicité de 4,9 et 1,3% pour le témoin et le traitement respectivement, $n=1$). **B)** En plus du traitement à la thapsigargine, l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique a été testée par le traitement des cellules avec une forte dose de potassium (K50). Le témoin était fait de la même solution que le K50 mais avec 45 mM moins de potassium (K5). Ce traitement a augmenté la sécrétion de Tau (cytotoxicité de 1,1 et 0% pour le témoin et le traitement respectivement, $n=1$). **C)** La diminution de B27, qui remplace le sérum chez les neurones, a induit une augmentation de sécrétion de Tau (cytotoxicité de 0% pour le témoin et le traitement, $n=1$). **D)** Le traitement à la rapamycine n'a pas eu d'effet sur la sécrétion de Tau (cytotoxicité de 0,6 et 1,3% pour le témoin et le traitement respectivement, $n=1$). **E)** Le traitement à la leupeptine a induit une importante augmentation de Tau dans le milieu extracellulaire (cytotoxicité de 3,4 et 10,3% pour le témoin et le traitement respectivement, $n=1$). **F)** Le traitement conjugué de la leupeptine avec la rapamycine révèle une plus grande quantité de Tau dans le milieu extracellulaire, augmentation qui pourrait être induite par la cytotoxicité élevée, qui est de 27% pour le traitement et 1,8% pour le témoin ($n=1$). Pour les figures A à D, les lysats ont été pris à une exposition différente des milieux afin de faciliter l'analyse visuelle des résultats. Les autres figures sont composées de milieux et de lysats provenant de la même exposition. T, témoin; Thap, thapsigargine; Rapa, rapamycine; Leup, leupeptine.



4. DISCUSSION

4.1. Résumé des résultats

Les expériences présentées dans ce mémoire ont permis de démontrer que dans les cellules HeLa, la protéine Tau est sécrétée par une voie de sécrétion non-conventionnelle. De plus, nous avons démontré que la protéine Tau hyperphosphorylée était davantage sécrétée que la protéine hypophosphorylée. Par contre, la protéine Tau se trouvant dans le milieu de culture est déphosphorylée comparativement à la protéine intracellulaire. D'autre part, Tau doit absolument être clivée afin d'être sécrétée par les cellules HeLa. La sécrétion de Tau a également été observée dans les cellules PC12 stablement transfectées avec la GFP-Tau4R et les cellules corticales de souris de type sauvage. Contrairement à ce qui était observé pour les cellules HeLa, la protéine Tau pleine longueur était sécrétée dans ces modèles, bien que plusieurs fragments de Tau étaient aussi présents dans le milieu de culture. De plus, nous avons observé qu'une élévation de calcium cytosolique provoquait une augmentation de la sécrétion de Tau. Finalement, nous avons démontré grâce à une série de traitements que la sécrétion de la protéine Tau est augmentée par un dérèglement de l'autophagie dans les PC12 et les neurones corticaux.

4.2. Sécrétion de la protéine Tau

Il est depuis longtemps connu que la protéine Tau forme des NFTs dans la MA et que ceux-ci se propagent dans le cerveau dans un ordre bien précis (Braak, Braak et al. 1994; Lace, Savva et al. 2009; Brundin, Melki et al. 2010). De plus, la protéine Tau se retrouve dans le LCS en absence de mort neuronale (Barten, Cadelina et al. 2011). Ces observations ont donc mené à l'hypothèse que la protéine Tau hyperphosphorylée libre pourrait être sécrétée par les neurones et que c'est ce mécanisme qui permettrait la propagation de sa pathologie dans le cerveau. Nous avons donc d'abord voulu démontrer la sécrétion de la protéine Tau par divers modèles cellulaires.

4.2.1. Tau est sécrétée par 3 types cellulaires différents

Dans la présente étude, nous avons utilisé 3 lignées cellulaires différentes, soit les cellules HeLa, les PC12 et les neurones corticaux de souris de type sauvage. Les cellules HeLa ont servi de modèle de surexpression de la GFP-Tau4R par une transfection transitoire. Les cellules PC12, tant qu'à elles, étaient stablement transfectées avec la GFP-Tau4R, créant ainsi un système surexprimant la protéine Tau de façon moindre que les HeLa. Finalement, nous avons utilisé un modèle physiologique, des cultures primaires de neurones corticaux, chez lesquels nous n'avons procédé à aucune transfection, examinant la sécrétion de Tau endogène. Hors, nous avons observé la sécrétion de Tau dans ces trois modèles (Figures 8 p.52, 14 p.73 et 16 p.83 pour les HeLa, PC12 et neurones respectivement). Plus le niveau d'expression était bas dans le lysat, plus la présence de Tau était difficile à détecter dans le milieu extracellulaire sans être concentré par IP. La lecture de la LDH nous a permis de constater que même dans les cas où aucune mort cellulaire n'était détectée, la protéine Tau était présente dans le milieu de culture, supportant le fait qu'elle était sécrétée selon un mécanisme actif. Nos résultats corroborent ceux publiés par l'équipe du Dr Hall, qui avaient rapporté que la protéine Tau était sécrétée lorsqu'elle était surexprimée dans les neurones de la lamproie et par les cellules de neuroblastomes de souris NB2a/d1 ainsi que par les cellules M1C (Kim, Lee et al. 2010; Kim, Lee et al. 2010; Saman, Kim et al. 2011). Cependant, ces études ne présentaient pas d'expériences convaincantes qui démontraient sans équivoque que la sécrétion de Tau ne résultait pas de la mort cellulaire. Dans la présente étude, nous avons utilisé plusieurs stratégies expérimentales afin de démontrer que la sécrétion de Tau dépendait d'un processus actif qui utilisait une voie non-conventionnelle de sécrétion. De plus, nos travaux démontrent la sécrétion de Tau par les neurones corticaux, une population de neurones affectée dans la MA. Dans leur dernière étude, l'équipe du Dr Hall rapporte qu'une partie de la protéine Tau qui est présente dans le milieu de culture et le LCS est associée aux exosomes. En conclusion, nos travaux et ceux de l'équipe du Dr Hall démontrent que la protéine Tau est sécrétée.

4.2.2. Investigation du mode de sécrétion emprunté par Tau

Les premiers signes de déclin cognitif apparaissent dans la MA lorsque la pathologie de Tau atteint l'hippocampe (Braak and Braak 1991). En se basant sur la théorie de la sécrétion de Tau, si on peut empêcher cette dernière de se propager jusqu'à cette région du cerveau, nous pourrions peut-être empêcher le déclin cognitif. L'investigation des voies de sécrétion était donc primordiale afin de déterminer quelle voie Tau emprunte et ainsi peut-être trouver une cible thérapeutique pouvant empêcher la sécrétion et la propagation de la pathologie de Tau.

4.2.2.1. Tau emprunte une ou des voies de sécrétion non-conventionnelles

Dans un premier temps, nous avons vérifié si la protéine Tau pouvait être sécrétée par la voie de sécrétion conventionnelle. Pour ce faire, nous avons traité les cellules HeLa avec la BFA, un bloqueur de la voie de sécrétion conventionnelle. Ce traitement n'a pas eu d'effet sur la sécrétion de Tau, son niveau étant égal aux cellules témoins ayant été traitées avec le véhicule de la BFA (Figure 10/A, p.61). Ce résultat n'était pas surprenant puisque les protéines empruntant cette voie doivent posséder une séquence de peptides les ciblant au réticulum endoplasmique pour leur synthèse (Osborne, Rapoport et al. 2005), séquence dont Tau est dépourvue.

Dans un deuxième temps, nous avons examiné si Tau était libérée par les cellules HeLa selon un mécanisme passif ou actif. Une protéine peut sortir de la cellule en traversant passivement la membrane plasmique. Ce type de diffusion passive n'est pas affecté par une diminution de température alors qu'un mécanisme actif de sécrétion l'est (Melchior and Gerace 1995). Afin de vérifier si la protéine Tau empruntait un mode de diffusion passive pour sortir de la cellule, nous avons incubé les cellules à 18 et 4°C et avons comparé le niveau de sécrétion de la protéine Tau au témoin laissé à 37°C. Ce traitement a diminué de façon importante la sécrétion de Tau, prouvant ainsi que cette protéine n'emprunte pas une voie de diffusion passive pour quitter la cellule mais plutôt une voie active (Figure 8/C, p.52). Ces résultats nous ont donc permis de conclure que la protéine Tau emprunte une des voies non-conventionnelles pour être sécrétée. Ce résultat n'était pas surprenant considérant que l' α -synucléine et le prion, deux protéines cytosoliques étant sécrétées dans la maladie de Parkinson et les maladies du prion

respectivement, empruntent aussi des voies de sécrétion non-conventionnelles (Fevrier, Vilette et al. 2004; Emmanouilidou, Melachroinou et al. 2010). Nous avons par la suite éliminé la possibilité que la sécrétion de la protéine Tau soit induite par son tag GFP en examinant la sécrétion de la Flag-Tau4R, Flag étant un tag beaucoup plus petit ne faisant que 27 paires de base. Les traitements de température et à la BFA ont donné les mêmes résultats avec la Flag-Tau4R qu'avec la GFP-Tau4R, démontrant de ce fait que la sécrétion de la protéine Tau n'était pas dû à la présence de la GFP.

4.2.2.2. Induction d'une augmentation de calcium intracellulaire

Par la suite, nous avons voulu tester l'effet d'une élévation de calcium intracellulaire sur la sécrétion de Tau. Le calcium est fondamental dans la régulation de l'exocytose, de la fusion des endosomes précoces et dans la sécrétion médiée par les exosomes (Mills, Urbe et al. 2001; Savina, Furlan et al. 2003; Barclay, Morgan et al. 2005). Le traitement des cellules PC12 avec la thapsigargine a mené à une augmentation de sécrétion de la protéine Tau (Figure 15/A, p.78). Par contre, aucun effet n'a été détecté dans les neurones (Figure 16/A, p.83). Nous avons donc voulu tester une autre drogue causant une élévation de calcium intracellulaire dans ce modèle cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé une forte dose de potassium afin de dépolariser les neurones et ainsi créer l'augmentation recherchée. Ce traitement a eu pour effet d'augmenter la sécrétion de Tau par les neurones (Figure 16/G, p.83). Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de calcium intracellulaire stimule la sécrétion de Tau. La divergence de résultat entre la thapsigargine et le KCl pourrait s'expliquer par un mécanisme d'action divergeant de ces deux drogues provoquant des effets différents à l'intérieur des cellules. En effet, la thapsigargine est une drogue ayant la capacité d'inhiber les pompes à ion Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique et du réticulum endoplasmique créant ainsi une élévation de calcium cytosolique. La dépolarisation tant qu'à elle permet l'entrée de calcium extracellulaire à l'intérieur de la cellule. Nous allons devoir tester d'autres concentrations de thapsigargine pour vérifier si l'absence d'effet n'était pas simplement due à l'inefficacité de la drogue à la concentration utilisée. Ces résultats démontrent donc que la protéine Tau est sécrétée par un mécanisme dépendant du calcium dans les deux modèles cellulaires

étudiés, tout comme pour la protéine α -synucléine impliquée dans la maladie de Parkinson (Emmanouilidou, Melachroinou et al. 2010).

4.2.2.3. Déficiets de l'autophagie dans la maladie d'Alzheimer

Dans la MA comme dans plusieurs autres maladies neurodégénératives, une accumulation d'autophagosomes a été observée. Dans la MA, les autophagosomes s'accumulent en grande quantité dans les neurites dystrophiques ainsi que dans le soma des neurones. La raison de cette accumulation dans la maladie n'est encore que peu connue, les hypothèses principales faisant état d'une induction de l'autophagie ou d'une diminution de l'élimination des autophagosomes (Boellaard, Schlote et al. 1989; Anglade, Vyas et al. 1997; Kegel, Kim et al. 2000; Ko, Milenkovic et al. 2005; Nixon, Wegiel et al. 2005). Pour que la dégradation par le système autophagosomes-lysosomes se fasse normalement, il doit y avoir un équilibre entre la formation des autophagosomes et leur élimination par les lysosomes (Chu 2006). Hors, des études ont démontré dans des cas de désordre du stockage lysosomal que des problèmes au niveau des lysosomes pouvaient causer une diminution de l'élimination des autophagosomes et ainsi provoquer leur accumulation (Kiselyov, Jennigs et al. 2007; Settembre, Fraldi et al. 2008). D'ailleurs, une altération du système lysosomal a été observée dans la maladie d'Alzheimer (Nixon, Cataldo et al. 2000; Nixon, Wegiel et al. 2005; Butler, Nixon et al. 2006). De plus, Boland et al. (2008) ont démontré que la pathologie au niveau des autophagosomes de la MA proviendrait d'un problème d'élimination des VAs plutôt que d'une forte induction de l'autophagie seule (Boland, Kumar et al. 2008).

Deux études récentes ont démontré que des protéines cytosoliques pouvaient être sécrétées par les autophagosomes. C'est le cas de Acb1, l'orthologue de ACBP («*acyl coenzyme A-binding protein*») chez la *Saccharomyces cerevisiae* (Duran, Anjard et al. 2010; Manjithaya, Anjard et al. 2010). L'induction de l'autophagie par une privation de nutriments ou par un traitement avec la rapamycine a augmenté la sécrétion de Acb 1. Selon ces études, il est peu probable que les autophagosomes fusionneraient directement avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu. Les résultats de ces études indiquent plutôt que les autophagosomes fusionneraient avec les endosomes précoces qui eux pourraient fusionner directement avec la membrane plasmique ou ils pourraient

maturer en CMVs et ensuite fusionner avec la membrane plasmique afin de libérer leur contenu sous forme d'exosomes. À la lumière de toutes ces observations et puisqu'il a déjà été montré que la protéine Tau peut être dégradée via l'autophagie (Wang, Martinez-Vicente et al. 2009), nous avons émis l'hypothèse que la protéine Tau pourrait être sécrétée par la voie de l'autophagie.

Dans la présente étude, l'effet d'une accumulation d'autophagosomes a donc été testé dans les cellules PC12 et les neurones corticaux. Il est par contre important de rappeler que les traitements effectués sur ces lignées cellulaires n'ont été testés qu'une seule fois. Chaque traitement devra donc être répété au moins 3 fois sur chaque système cellulaire avant de pouvoir définitivement conclure que l'induction de l'autophagie augmente la sécrétion de Tau. Ainsi, les divers traitements utilisés sur les cellules PC12 ont tous suggéré que l'accumulation d'autophagosomes provoquait une augmentation de sécrétion de la protéine Tau. Cependant, lorsqu'une augmentation de l'autophagie a été induite, aucune augmentation de sécrétion de Tau n'a été observée, probablement due au fait que les autophagosomes produits étaient immédiatement éliminés par les lysosomes (Figure 15/B-C, p.78). Par contre, lorsque l'activité des lysosomes a été réduite afin de permettre une accumulation des autophagosomes, la sécrétion de Tau a été augmentée mais de façon moindre que lorsque la diminution d'activité lysosomale a été couplée à une induction de l'autophagie, ce qui a provoqué une accumulation d'autophagosomes beaucoup plus importante (Figure 15/D-E respectivement, p.78). Par contre, il sera important dans les expériences futures de vérifier que nos drogues ont bel et bien provoqué l'accumulation d'autophagosomes et que, par conséquent, la sécrétion de Tau provient de ce phénomène et non d'un autre effet pouvant avoir été causé par ces traitements. Pour ce faire, trois approches pourront être utilisées, soit l'observation des cellules par microscopie électronique ou à fluorescence ou par des essais biochimiques permettant la détection de la forme de LC3 associée aux membranes, un marqueur de l'autophagie (Mizushima, Yoshimori et al. 2010). Pour les neurones, bien qu'une importante mort cellulaire nous empêche de conclure de façon certaine de l'effet d'une accumulation des autophagosomes sur la sécrétion de Tau, les résultats concordent tout de même avec ce qui était observé pour les PC12 (Figure 16/C-F, p.83). Au final, nos expériences suggèrent que l'accumulation des autophagosomes observée dans la MA pourrait contribuer à la sécrétion de la protéine Tau et ainsi à la propagation de sa pathologie dans le cerveau.

4.3. Caractérisation de la protéine Tau sécrétée

4.3.1. La protéine Tau sécrétée est clivée en C-terminal

Dans les expériences réalisées, il y avait toujours présence de Tau clivée en intra et extracellulaire. La présence de Tau extracellulaire clivée dans nos différents modèles n'était pas surprenante puisque plusieurs fragments de la protéine Tau ont été retrouvés dans le LCS humain (Johnson, Seubert et al. 1997; Borroni, Gardoni et al. 2009).

Afin de déterminer le site de clivage de la protéine Tau sécrétée par les cellules HeLa, nous avons testé divers anticorps dirigés contre les portions du MTBR, du N- et du C-terminal de Tau. Nous avons ainsi pu observer que la bande majeure de Tau retrouvée dans le milieu de culture contient la portion N-terminale alors que la portion C-terminale est clivée (Figure 13, p.70). De plus, le fait que nous n'avons détecté aucun marquage pour l'anticorps pS422 lors de l'investigation du motif de phosphorylation de Tau, nous indique que la protéine Tau extracellulaire pourrait être clivée entre les sites S409 et S422 (Figure 11, p.64). Ces résultats nous ont donc permis de constater que la protéine Tau doit absolument être clivée en C-terminal pour permettre sa sécrétion par les cellules HeLa. Ce clivage en C-terminal de la protéine Tau sécrétée a corroboré les résultats de plusieurs études ayant déjà dénoté le clivage de cette protéine en C-terminal. D'abord, l'étude de Saman et al. réalisée sur des cellules M1C a également démontré que la protéine Tau sécrétée par les exosomes était clivée en C-terminal alors que les autres parties de la protéine étaient intactes (Saman, Kim et al. 2011). De plus, une étude réalisée sur trois modèles de souris transgéniques a montré la présence de fragments de Tau dans le LCS de ces souris, fragments qui étaient pour la plupart clivés en C-terminal. Qui plus est, différentes études portant sur la protéine Tau présente dans le LCS humain ont démontré que la majorité des fragments de Tau détectés ne possédaient pas la portion C-terminale (Johnson, Seubert et al. 1997; Siman, McIntosh et al. 2004; Borroni, Gardoni et al. 2009). Tous ces résultats démontrent donc que la protéine Tau extracellulaire est généralement clivée en C-terminal.

Il existe plusieurs enzymes pouvant cliver la protéine Tau en C-terminal. C'est le cas notamment des caspases 1, 3, 6, 7 et 8, de la cathepsine D et L et des calpaines 1 et 2. Puisque nos résultats suggèrent que Tau est clivée entre la S409 et S422, les caspases 1, 3, 6, 7 et 8 pourraient être de bons candidats puisqu'ils ont tous la capacité de cliver Tau à

l'aspartate 421 (Fasulo, Ugolini et al. 2000; Chung, Song et al. 2001; Gamblin, Chen et al. 2003). Les cathepsines, tant qu'à elles, sont des enzymes lysosomales. Lors de dysfonctions lysosomales dans des cerveaux âgés, il a été observé que les cathepsines pouvaient fuir des lysosomes et ainsi se retrouver dans le cytoplasme où elles peuvent cliver Tau (Nakanishi, Amano et al. 1997). Dans un modèle de tauopathie inducible du neuroblastome de souris N2a exprimant le domaine de répétitions de Tau avec une mutation associée à la FTDP-17 (Tau_{RD}ΔK280), la protéine Tau était clivée par la cathepsine L après l'isoleucine 360 et la valine 363 (Wang, Martinez-Vicente et al. 2009). La cathepsine D, tant qu'à elle, peut cliver la protéine Tau recombinante entre les acides aminés 419-420, entre autre (Kenessey, Nacharaju et al. 1997). Les calpaines sont des protéases cystéines cytosoliques activées par le calcium. Il a été montré *in vitro* que lorsque Tau est digérée par les calpaines 1 et 2, celle-ci conserve sa portion N-terminale (Johnson, Jope et al. 1989; Yang and Ksiezak-Reding 1995). Au final, ces enzymes pouvant cliver Tau dans sa portion C-terminale sont les plus susceptibles de cliver Tau entre la S409 et 422 dans notre modèle cellulaire.

Par contre, le motif de clivage de la protéine différait d'un système cellulaire à l'autre dans nos expériences. En effet, on a pu remarquer que dans les cellules HeLa, la protéine Tau pleine longueur n'était jamais sécrétée alors qu'elle était bien exprimée comme en témoignait sa présence dans le lysat cellulaire (Figure 8/B, p.52). Il existe à l'heure actuelle une controverse sur la présence de la protéine Tau pleine longueur dans le LCS. Nos résultats avec les cellules HeLa concordent avec ce qui a été rapporté par l'étude de Johnson et al. qui démontre que la protéine Tau pleine longueur est absente du LCS de patients souffrant de MA, de patients atteints d'accident vasculaire cérébral et de personnes âgées non-atteintes de démence alors que des fragments de Tau de 26-28 kDa et moins étaient observés (Johnson, Seubert et al. 1997). Par contre, d'autres études contredisent ces résultats en démontrant la présence de la protéine Tau pleine longueur dans le LCS humain (Borroni, Gardoni et al. 2009). Lorsque la sécrétion de Tau a été étudiée dans la lamproie, la protéine Tau extracellulaire se trouvait sous forme pleine longueur et clivée (Kim, Lee et al. 2010; Saman, Kim et al. 2011), tout comme observé dans la présente étude pour les PC12 et les neurones corticaux de souris. La différence de clivage observée entre nos différents modèles vient probablement de la divergence de type cellulaire. En effet, les cellules utilisées par le Dr Hall, tel que cité précédemment, sont toutes d'origine neuronale. Les cellules PC12 tant qu'à elles sont dérivées d'un phéochromocytome de rat, une

affection tumorale des cellules chromaffines de la médullosurrénale. Lorsque cette lignée cellulaire a été mise au point par Greene et Tischler en 1976, ils ont décrit les PC12 comme possédant une pluripotence spécifique aux cellules primitives progénitrices. Ainsi, les cellules PC12 ont la capacité, via exposition au NGF de se différencier en neurones sympathiques (Greene and Tischler 1976). Bien que dans notre étude nous n'ayons pas différencié les cellules PC12, il est possible qu'elles aient quelques particularités en commun au niveau des voies de sécrétion avec les cellules neuronales. Les HeLa, tant qu'à elles, sont dérivées d'un adénocarcinome humain, une tumeur maligne s'étant développée dans l'épithélium glandulaire du col utérin (Masters 2002). Ces cellules non-neuronales pourraient donc posséder une population de protéases différente des cellules neuronales, ou bien la protéine Tau pourrait emprunter une voie de sécrétion différente dans ce type de cellule, expliquant la différence dans le clivage de Tau par celles-ci. Au final, que la raison de la divergence de clivage provienne du fait de différences intrinsèques des lignées neuronales et non neuronales ou tout simplement de lignées cellulaires différentes, il n'en demeure pas moins que la protéine Tau est sécrétée par tous ces modèles cellulaires, renforçant la conclusion que la sécrétion de Tau pourrait contribuer à la propagation de sa pathologie dans la MA.

4.3.2. Déphosphorylation de la protéine Tau sécrétée

Nous avons analysé l'état de phosphorylation de la protéine Tau sécrétée par les cellules HeLa. Ces expériences nous ont permis de découvrir que la protéine Tau extracellulaire était beaucoup moins phosphorylée que la protéine Tau intracellulaire pour la majorité des sites étudiés (Figure 11, p.64). Ces résultats corrélerent avec les observations faites sur la protéine Tau dans le LCS de patients atteints de la MA. En effet, la quantité totale de Tau dans le LCS est beaucoup plus grande que celle de la protéine Tau phosphorylée (Ishiguro, Ohno et al. 1999) indiquant que Tau pourrait être déphosphorylée dans le LCS. De plus, des études récentes indiquent fortement que l'augmentation de Tau dans le LCS au cours de la MA ne proviendrait pas de la mort neuronale mais plutôt de la sécrétion accrue de Tau (Barten, Cadelina et al. 2011). Ces résultats démontrent donc que, bien que la protéine Tau intracellulaire soit fortement phosphorylée, la protéine extracellulaire est, tant qu'à elle, déphosphorylée. Voici donc trois possibilités afin

d'expliquer ce phénomène. D'abord, il se pourrait que la protéine Tau hypophosphorylée soit davantage sécrétée que la protéine Tau hyperphosphorylée, expliquant de ce fait que la population de Tau phosphorylée reste davantage en intracellulaire. Cette possibilité est peu probable puisque nos résultats démontrent que la protéine Tau hyperphosphorylée est davantage sécrétée que la protéine Tau hypophosphorylée (résultats discutés dans la section suivante). Deuxièmement, une étude réalisée par le Dr Avila a démontré que la protéine Tau extracellulaire, provenant de la mort cellulaire dans son étude, pouvait être déphosphorylée par la phosphatase alcaline non-spécifique aux tissus (TNAP) (Diaz-Hernandez, Gomez-Ramos et al. 2010). Dans un tel cas, si la protéine Tau hyperphosphorylée est sécrétée, la TNAP pourrait la déphosphoryler une fois rendue dans le milieu extracellulaire. Cette enzyme est abondante dans le système nerveux central et est présente à la surface extracellulaire de la membrane plasmique des cellules (Diaz-Hernandez, Gomez-Ramos et al. 2010). Par contre, il n'est pas dit que les cellules HeLa possèdent cette enzyme à la surface membranaire extracellulaire. Il sera donc important dans de futures expériences de tester la présence de cette enzyme dans notre système cellulaire. La troisième possibilité pouvant expliquer la déphosphorylation de la protéine Tau extracellulaire est que cette dernière pourrait être déphosphorylée dans les voies de sécrétion qu'elle emprunte. Il serait en effet possible que la voie de sécrétion empruntée par Tau soit riche en phosphatases qui pourraient la déphosphoryler durant son passage. Toutes ces hypothèses sont donc plausibles et devront par conséquent être explorées afin de déterminer par quel processus la protéine Tau sécrétée est déphosphorylée.

4.4. L'hyperphosphorylation de Tau favorise sa sécrétion

Après avoir observé que la protéine Tau hyperphosphorylée se trouvait principalement dans les cellules et non en extracellulaire, nous avons voulu vérifier si ce phénomène n'était pas simplement imputable au fait que la protéine Tau hypophosphorylée était davantage sécrétée que la protéine hyperphosphorylée. Pour ce faire, nous avons transfecté les cellules HeLa avec les mutants GFP-E12 et GFP-A12, mimant et empêchant la phosphorylation respectivement de Tau à 12 sites. Ainsi, nous avons pu constater que la protéine Tau hyperphosphorylée était $2,51 \pm 0,55$ fois plus sécrétée que la protéine Tau de type sauvage et $1,94 \pm 0,45$ fois plus sécrétée que la protéine Tau hypophosphorylée

(Figure 12, p.67). Ces données démontrent donc que l'hyperphosphorylation de Tau facilite sa sécrétion. Ce résultat est consistant avec le fait que la propagation de la pathologie de Tau dans le cerveau et son augmentation dans le LCS est corrélée à son hyperphosphorylation dans la MA et les autres tauopathies. Également, il serait possible que la phosphorylation de Tau à certains sites soit nécessaire pour que la protéine puisse avoir accès à certaines voies de sécrétion. En effet, nos travaux antérieurs ont démontré que l'hyperphosphorylation de Tau augmente son association avec les organelles membranaires dont le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi qui sont impliqués dans la voie de sécrétion conventionnelle et les voies de sécrétion non-conventionnelles (Perreault, Bousquet et al. 2009). Alors que l'hyperphosphorylation de Tau favorise sa sécrétion, la protéine Tau sécrétée est déphosphorylée. Toutes ces observations indiquent que la déphosphorylation de la protéine Tau sécrétée se produit probablement à l'intérieur des voies de sécrétion ou en extracellulaire par le biais de la phosphatase TNAP, localisée à la membrane plasmique.

4.5. Implications de la sécrétion de Tau dans la MA

Les résultats obtenus au cours de cette maîtrise permettent d'élaborer de nouvelles hypothèses sur les mécanismes de propagation de la pathologie de Tau et sur les mécanismes de toxicité de Tau dans la MA. Le fait d'avoir démontré que la protéine Tau endogène des neurones corticaux peut être sécrétée sans surexpression permet de spéculer que cette sécrétion pourrait contribuer à la propagation de la pathologie de Tau dans les cerveaux Alzheimer, phénomène qui était jusqu'à présent mal compris.

Toutes ces nouvelles informations permettent de spéculer sur la séquence d'événements qui pourraient être impliqués dans la propagation de la pathologie de Tau dans la MA. En se basant sur nos résultats ainsi qu'à ceux d'autres laboratoires, il semble qu'un cycle de rétroaction positive de la sécrétion de Tau pourrait contribuer à cette propagation. Dans la MA, Tau devient anormalement hyperphosphorylée. Cette Tau hyperphosphorylée a moins d'affinité pour les microtubules ce qui cause leur dissociation et une élévation de Tau libre dans le cytoplasme (Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986; Iqbal, Grundke-Iqbal et al. 1986; Alonso, Zaidi et al. 1994). Le détachement de Tau hyperphosphorylée des microtubules pourrait augmenter son accès à des voies de sécrétion

comme indiqué par nos résultats démontrant que l'hyperphosphorylation de Tau augmente sa sécrétion. Par la suite, la protéine Tau extracellulaire pourrait être déphosphorylée par la phosphatase TNAP, très abondante dans le cerveau. Cette Tau extracellulaire déphosphorylée interagit davantage avec les récepteurs muscariniques M1 et M3 se trouvant à la surface des neurones. Ces récepteurs, une fois activés par Tau, vont faire augmenter la concentration de calcium intracellulaire (Diaz-Hernandez, Gomez-Ramos et al. 2010). Cette augmentation de calcium cytosolique, en plus d'activer des kinases qui à leur tour induisent la phosphorylation de Tau, va augmenter la sécrétion par des voies non-conventionnelles tels que les exosomes. Au final, la sécrétion de Tau pourrait permettre une série d'événements qui permettrait de déclencher un cycle menant à l'augmentation de cette sécrétion.

Dans la MA, la protéine Tau hyperphosphorylée est séquestrée dans les NFTs (Lee, Goedert et al. 2001). Il serait donc possible que la formation des NFTs soit neuroprotectrice en provoquant une diminution de la sécrétion de Tau. Hors, comme discuté dans l'introduction, un débat a actuellement lieu sur ce sujet puisque la toxicité des NFTs est remise en question. En effet, il a été démontré qu'un neurone pouvait survivre pendant des années à la présence de NFTs intracellulaires (Gendron and Petrucelli 2009). Dans cette optique, si la protéine Tau hyperphosphorylée est tout d'abord séquestrée sous forme de NFTs, cela contribuerait à diminuer la concentration cytoplasmique de Tau libre et devrait par conséquent diminuer sa sécrétion. Cependant, il est possible que ce mécanisme de protection perde de son efficacité au fur et à mesure que la concentration de Tau hyperphosphorylée augmente au cours de la maladie. Une telle situation mènerait à l'augmentation de la sécrétion de Tau et déclencherait donc le cycle de sécrétion de Tau. En bref, la formation d'agrégats de Tau pourrait être un mécanisme neuroprotecteur qui, une fois saturé, ne peut plus empêcher la sécrétion de Tau et donc la propagation de la pathologie de Tau. L'observation que la protéine Tau peut être sécrétée ouvre la porte à une panoplie d'idées nouvelles pouvant mener à l'élaboration de traitements visant à prévenir l'accumulation de la protéine Tau extracellulaire et potentiellement, la propagation de la MA.

4.6. Perspectives futures

La première priorité du laboratoire sera de terminer l'investigation des voies de sécrétion empruntées par Tau et plus particulièrement de confirmer le rôle de l'autophagie dans cette sécrétion. Pour ce faire, une inhibition plus spécifique de la macroautophagie pourra être réalisée grâce à l'inhibition de différents composants nécessaires à ce mécanisme. Par exemple, une déficience ou réduction de l'autophagie a été confirmée dans les cellules déficientes pour les gènes Atg5 (Mizushima, Yamamoto et al. 2001) et Atg7 (Komatsu, Waguri et al. 2005), nécessaires pour l'élongation des membranes lors de l'autophagie et les gènes FIP200 (Hara, Takamura et al. 2008) et Ambra1 (Fimia, Stoykova et al. 2007), nécessaires pour la nucléation et donc le déclenchement du mécanisme d'autophagie. De plus, la sécrétion de la protéine Tau via une voie d'autophagie Atg5 et 7 indépendante pourrait être bloquée en inhibant les protéines Ulk1 ou beclin 1 (Nishida, Arakawa et al. 2009). Ainsi, différents ARNs interférants pourront être utilisés afin d'inhiber certains de ces gènes. D'ailleurs, la lignée de fibroblastes embryonnaires déficients en Atg5 pourra être, entre autre, utilisée (Kuma, Hatano et al. 2004).

Finalement, il faudrait vérifier si la déphosphorylation de la protéine Tau extracellulaire observée dans notre modèle de cellules HeLa provient de l'action de la TNAP, d'une autre phosphatase extracellulaire ou d'une déphosphorylation intracellulaire lors de la sécrétion de Tau. Ces objectifs à court terme nous permettront d'élucider davantage les mécanismes de sécrétion de la protéine, mais le travail restant afin de comprendre l'ensemble du mécanisme de neurodégénération dans la MA reste long et laborieux, bien que de grands progrès soit imminents dans ce domaine.

4.7. Conclusion

Notre étude a permis de confirmer la sécrétion de la protéine Tau par plusieurs types cellulaires, en particulier par des neurones corticaux, une population de cellules affectée dans la MA. Il devient donc possible de postuler que la propagation de la pathologie de Tau dans les tauopathies pourrait impliquer sa sécrétion par les neurones affectés. De plus, nos travaux démontrent que bien que l'hyperphosphorylation de Tau favorise sa sécrétion, la protéine Tau extracellulaire est déphosphorylée. Des études antérieures ont démontré que la protéine Tau extracellulaire est toxique et que cette toxicité est augmentée lorsque Tau est non-phosphorylée. Toutes ces observations nous permettent de spéculer que dans la MA, l'hyperphosphorylation de Tau pourrait augmenter sa sécrétion et ainsi la propagation de sa pathologie alors que l'accumulation de Tau hypophosphorylée dans le milieu extracellulaire pourrait contribuer par sa toxicité à induire la mort neuronale. Cette nouvelle hypothèse permettra l'élaboration de diverses approches thérapeutiques pour empêcher la sécrétion de Tau et ainsi prévenir ou ralentir la progression de la maladie.

5. LISTE DE RÉFÉRENCES

- Aamodt, E. J. and R. C. Williams, Jr. (1984). "Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro." Biochemistry **23**(25): 6023-6031.
- Abraha, A., N. Ghoshal, et al. (2000). "C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease." J Cell Sci **113 Pt 21**: 3737-3745.
- Al-Bassam, J., R. S. Ozer, et al. (2002). "MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments." The Journal of cell biology **157**(7): 1187-1196.
- Allinson, T. M., E. T. Parkin, et al. (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." Journal of neuroscience research **74**(3): 342-352.
- Alonso, A., T. Zaidi, et al. (2001). "Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6923-6928.
- Alonso, A. C., T. Zaidi, et al. (1994). "Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(12): 5562-5566.
- Andorfer, C., Y. Kress, et al. (2003). "Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms." Journal of neurochemistry **86**(3): 582-590.
- Andreadis, A., W. M. Brown, et al. (1992). "Structure and novel exons of the human tau gene." Biochemistry **31**(43): 10626-10633.
- Andreasen, N., C. Hesse, et al. (1999). "Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease." Archives of neurology **56**(6): 673-680.
- Andreasen, N., L. Minthon, et al. (2001). "Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice." Archives of neurology **58**(3): 373-379.
- Andrei, C., C. Dazzi, et al. (1999). "The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles." Molecular biology of the cell **10**(5): 1463-1475.
- Andrei, C., P. Margiocco, et al. (2004). "Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(26): 9745-9750.
- Anglade, P., S. Vyas, et al. (1997). "Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease." Histology and histopathology **12**(1): 25-31.
- Arai, H., M. Terajima, et al. (1995). "Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease." Annals of neurology **38**(4): 649-652.
- Aronov, S., G. Aranda, et al. (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): 6577-6587.
- Aronov, S., G. Aranda, et al. (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): 3817-3827.
- Arrasate, M., M. Perez, et al. (2000). "Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane." Neurochemical research **25**(1): 43-50.

- Arriagada, P. V., J. H. Growdon, et al. (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." Neurology **42**(3 Pt 1): 631-639.
- Augustinack, J. C., A. Schneider, et al. (2002). "Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease." Acta neuropathologica **103**(1): 26-35.
- Avila, J., J. J. Lucas, et al. (2004). "Role of tau protein in both physiological and pathological conditions." Physiol Rev **84**(2): 361-384.
- Bancher, C., C. Brunner, et al. (1989). "Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Brain Res **477**(1-2): 90-99.
- Banker, G., Goslin, K. (1998). Culturing nerve cells.
- Barclay, J. W., A. Morgan, et al. (2005). "Calcium-dependent regulation of exocytosis." Cell calcium **38**(3-4): 343-353.
- Barten, D. M., G. W. Cadelina, et al. (2011). "Tau transgenic mice as models for cerebrospinal fluid tau biomarkers." Journal of Alzheimer's disease : JAD **24** **Suppl 2**: 127-141.
- Benzing, W. C., M. D. Ikonovic, et al. (1993). "Evidence that transmitter-containing dystrophic neurites precede paired helical filament and Alz-50 formation within senile plaques in the amygdala of nondemented elderly and patients with Alzheimer's disease." The Journal of comparative neurology **334**(2): 176-191.
- Bertrand, J., V. Plouffe, et al. (2010). "The pattern of human tau phosphorylation is the result of priming and feedback events in primary hippocampal neurons." Neuroscience **168**(2): 323-334.
- Bertrand, J., P. Senechal, et al. (2010). "The formation of tau pathological phospho-epitopes in the axon is prevented by the dephosphorylation of selective sites in primary hippocampal neurons over-expressing human tau." Journal of neurochemistry **114**(5): 1353-1367.
- Bian, H., J. C. Van Swieten, et al. (2008). "CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology." Neurology **70**(19 Pt 2): 1827-1835.
- Biernat, J., N. Gustke, et al. (1993). "Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding." Neuron **11**(1): 153-163.
- Biernat, J. and E. M. Mandelkow (1999). "The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains." Mol Biol Cell **10**(3): 727-740.
- Binder, L. I., A. Frankfurter, et al. (1985). "The distribution of tau in the mammalian central nervous system." The Journal of cell biology **101**(4): 1371-1378.
- Blennow, K. (2004). "Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease." NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics **1**(2): 213-225.
- Blennow, K., M. J. de Leon, et al. (2006). "Alzheimer's disease." Lancet **368**(9533): 387-403.
- Blennow, K. and E. Vanmechelen (2003). "CSF markers for pathogenic processes in Alzheimer's disease: diagnostic implications and use in clinical neurochemistry." Brain research bulletin **61**(3): 235-242.

- Blennow, K., E. Vanmechelen, et al. (2001). "CSF total tau, Abeta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease." Molecular neurobiology **24**(1-3): 87-97.
- Blommaert, E. F., J. J. Luiken, et al. (1995). "Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes." The Journal of biological chemistry **270**(5): 2320-2326.
- Boellaard, J. W., W. Schlote, et al. (1989). "Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease." Acta neuropathologica **78**(4): 410-418.
- Boland, B., A. Kumar, et al. (2008). "Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **28**(27): 6926-6937.
- Borroni, B., F. Gardoni, et al. (2009). "Pattern of Tau forms in CSF is altered in progressive supranuclear palsy." Neurobiology of aging **30**(1): 34-40.
- Braak, E., H. Braak, et al. (1994). "A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads." Acta Neuropathol **87**(6): 554-567.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta neuropathologica **82**(4): 239-259.
- Brady, R. M., R. P. Zinkowski, et al. (1995). "Presence of tau in isolated nuclei from human brain." Neurobiology of aging **16**(3): 479-486.
- Bramblett, G. T., M. Goedert, et al. (1993). "Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding." Neuron **10**(6): 1089-1099.
- Brandt, R. and G. Lee (1993). "The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules." Journal of neurochemistry **61**(3): 997-1005.
- Brandt, R., J. Leger, et al. (1995). "Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain." The Journal of cell biology **131**(5): 1327-1340.
- Brettschneider, J., M. Maier, et al. (2005). "Tau protein level in cerebrospinal fluid is increased in patients with early multiple sclerosis." Multiple sclerosis **11**(3): 261-265.
- Brettschneider, J., A. Petzold, et al. (2006). "Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS." Neurology **66**(6): 852-856.
- Brion, J. P., J. Guilleminot, et al. (1988). "Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum." Neuroscience **25**(1): 139-146.
- Brundin, P., R. Melki, et al. (2010). "Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases." Nature reviews. Molecular cell biology **11**(4): 301-307.
- Buee, L., T. Bussiere, et al. (2000). "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." Brain research. Brain research reviews **33**(1): 95-130.
- Buerger, K., R. Zinkowski, et al. (2002). "Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231." Archives of neurology **59**(8): 1267-1272.
- Butler, D., R. A. Nixon, et al. (2006). "Potential compensatory responses through autophagic/lysosomal pathways in neurodegenerative diseases." Autophagy **2**(3): 234-237.

- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, et al. (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." The Journal of biological chemistry **273**(43): 27765-27767.
- Caceres, A. and K. S. Kosik (1990). "Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons." Nature **343**(6257): 461-463.
- Caceres, A., S. Potrebic, et al. (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): 1515-1523.
- Carlier, M. F., C. Simon, et al. (1984). "Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin." Biochimie **66**(4): 305-311.
- Carmel, G., E. M. Mager, et al. (1996). "The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology." The Journal of biological chemistry **271**(51): 32789-32795.
- Caughey, B. and P. T. Lansbury (2003). "Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders." Annual review of neuroscience **26**: 267-298.
- Chapman, P. F., G. L. White, et al. (1999). "Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice." Nature neuroscience **2**(3): 271-276.
- Chen, J., Y. Kanai, et al. (1992). "Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons." Nature **360**(6405): 674-677.
- Chin, J. (2011). "Selecting a mouse model of Alzheimer's disease." Methods in molecular biology **670**: 169-189.
- Chu, C. T. (2006). "Autophagic stress in neuronal injury and disease." Journal of neuropathology and experimental neurology **65**(5): 423-432.
- Chung, C. W., Y. H. Song, et al. (2001). "Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3." Neurobiology of disease **8**(1): 162-172.
- Clark, L. N., P. Poorkaj, 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): 13103-13107.
- Clavaguera, F., T. Bolmont, et al. (2009). "Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain." Nature cell biology **11**(7): 909-913.
- Cleveland, D. W., S. Y. Hwo, et al. (1977). "Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin." Journal of molecular biology **116**(2): 207-225.
- Corces, V. G., R. Manso, et al. (1980). "Effects of DNA on microtubule assembly." Eur J Biochem **105**(1): 7-16.
- Correas, I., R. Padilla, et al. (1990). "The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding." The Biochemical journal **269**(1): 61-64.
- Couchie, D., C. Mavilia, et al. (1992). "Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4378-4381.
- Cross, D. C., J. P. Munoz, et al. (2000). "Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau." J Cell Biochem **78**(2): 305-317.

- Cupers, P., I. Orlans, et al. (2001). "The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture." Journal of neurochemistry **78**(5): 1168-1178.
- Danielsen, E. M., B. van Deurs, et al. (2003). ""Nonclassical" secretion of annexin A2 to the luminal side of the enterocyte brush border membrane." Biochemistry **42**(49): 14670-14676.
- Dawson, H. N., A. Ferreira, et al. (2001). "Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice." Journal of cell science **114**(Pt 6): 1179-1187.
- Diaz-Hernandez, M., A. Gomez-Ramos, et al. (2010). "Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau." The Journal of biological chemistry **285**(42): 32539-32548.
- DiTella, M. C., F. Feiguin, et al. (1996). "MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth." Journal of cell science **109** (Pt 2): 467-477.
- Dixit, R., J. L. Ross, et al. (2008). "Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau." Science **319**(5866): 1086-1089.
- Drechsel, D. N., A. A. Hyman, et al. (1992). "Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau." Molecular biology of the cell **3**(10): 1141-1154.
- Drubin, D. G. and M. W. Kirschner (1986). "Tau protein function in living cells." The Journal of cell biology **103**(6 Pt 2): 2739-2746.
- Dubey, M., P. Chaudhury, et al. (2008). "Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability." Cell Motil Cytoskeleton **65**(2): 89-99.
- Duran, J. M., C. Anjard, et al. (2010). "Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes." The Journal of cell biology **188**(4): 527-536.
- Ebneth, A., G. Drewes, et al. (1999). "Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells." Cell motility and the cytoskeleton **44**(3): 209-224.
- Ebneth, A., R. Godemann, et al. (1998). "Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease." J Cell Biol **143**(3): 777-794.
- Emmanouilidou, E., K. Melachroinou, et al. (2010). "Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **30**(20): 6838-6851.
- Esch, F. S., P. S. Keim, et al. (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." Science **248**(4959): 1122-1124.
- Evin, G. and A. Weidemann (2002). "Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A beta amyloid peptides." Peptides **23**(7): 1285-1297.
- Farah, C. A., S. Perreault, et al. (2006). "Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules." Cell motility and the cytoskeleton **63**(11): 710-724.
- Fasulo, L., G. Ugolini, et al. (2000). "The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis." Journal of neurochemistry **75**(2): 624-633.

- Fath, T., J. Eidenmuller, et al. (2002). "Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **22**(22): 9733-9741.
- Faure, J., G. Lachenal, et al. (2006). "Exosomes are released by cultured cortical neurones." Molecular and cellular neurosciences **31**(4): 642-648.
- Feuillette, S., L. Miguel, et al. (2010). "Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein." Journal of neurochemistry **113**(4): 895-903.
- Fevrier, B., D. Vilette, et al. (2004). "Cells release prions in association with exosomes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(26): 9683-9688.
- Fimia, G. M., A. Stoykova, et al. (2007). "Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system." Nature **447**(7148): 1121-1125.
- Flieger, O., A. Engling, et al. (2003). "Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter." FEBS letters **551**(1-3): 78-86.
- Friedhoff, P., M. von Bergen, et al. (2000). "Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments." Biochimica et biophysica acta **1502**(1): 122-132.
- Gamblin, T. C., F. Chen, et al. (2003). "Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(17): 10032-10037.
- Gao, Y. and S. W. Pimplikar (2001). "The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(26): 14979-14984.
- Gendron, T. F. and L. Petrucelli (2009). "The role of tau in neurodegeneration." Molecular neurodegeneration **4**: 13.
- Giuditta, A., J. T. Chun, et al. (2008). "Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit." Physiological reviews **88**(2): 515-555.
- Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein." Biochemical and biophysical research communications **122**(3): 1131-1135.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature **349**(6311): 704-706.
- Goedert, M. (1999). "Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies." Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences **354**(1386): 1101-1118.
- Goedert, M. (2004). "Tau protein and neurodegeneration." Seminars in cell & developmental biology **15**(1): 45-49.
- Goedert, M., R. Jakes, et al. (1996). "Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans." Nature **383**(6600): 550-553.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, et al. (1992). "Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms." Neuron **8**(1): 159-168.

- Goedert, M., M. G. Spillantini, et al. (1992). "Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1983-1987.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, et al. (1989). "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." Neuron **3**(4): 519-526.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, et al. (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): 393-399.
- Goedert, M., C. M. Wischik, et al. (1988). "Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(11): 4051-4055.
- Goldgaber, D., M. I. Lerman, et al. (1987). "Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging." Journal of neural transmission. Supplementum **24**: 23-28.
- Gomez-Ramos, A., M. Diaz-Hernandez, et al. (2006). "Extracellular tau is toxic to neuronal cells." FEBS letters **580**(20): 4842-4850.
- Gomez-Ramos, A., M. Diaz-Hernandez, et al. (2008). "Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells." Molecular and cellular neurosciences **37**(4): 673-681.
- Gong, C. X., T. J. Singh, et al. (1993). "Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain." Journal of neurochemistry **61**(3): 921-927.
- Goode, B. L., P. E. Denis, et al. (1997). "Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly." Molecular biology of the cell **8**(2): 353-365.
- 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): 769-782.
- Gotz, J., F. Chen, et al. (2001). "Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau." The Journal of biological chemistry **276**(1): 529-534.
- Gotz, J. and L. M. Ittner (2008). "Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." Nature reviews. Neuroscience **9**(7): 532-544.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **73**(7): 2424-2428.
- Grossman, M., J. Farmer, et al. (2005). "Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease." Annals of neurology **57**(5): 721-729.
- Gruenberg, J. and H. Stenmark (2004). "The biogenesis of multivesicular endosomes." Nature reviews. Molecular cell biology **5**(4): 317-323.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986). "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." The Journal of biological chemistry **261**(13): 6084-6089.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (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): 4913-4917.
- Guillozet-Bongaarts, A. L., M. E. Cahill, et al. (2006). "Pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: in vitro evidence and implications for tangle formation in vivo." Journal of neurochemistry **97**(4): 1005-1014.
- Haase, C., J. T. Stieler, et al. (2004). "Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation." J Neurochem **88**(6): 1509-1520.
- Hampel, H. and K. Blennow (2004). "CSF tau and beta-amyloid as biomarkers for mild cognitive impairment." Dialogues in clinical neuroscience **6**(4): 379-390.
- Hampel, H., K. Buerger, et al. (2001). "Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231." Annals of neurology **49**(4): 545-546.
- Hampel, H., K. Buerger, et al. (2004). "Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study." Archives of general psychiatry **61**(1): 95-102.
- Hanger, D. P., B. H. Anderton, et al. (2009). "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease." Trends in molecular medicine **15**(3): 112-119.
- Hanger, D. P., H. L. Byers, et al. (2007). "Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis." The Journal of biological chemistry **282**(32): 23645-23654.
- Hara, T., A. Takamura, et al. (2008). "FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells." The Journal of cell biology **181**(3): 497-510.
- Harada, A., K. Oguchi, et al. (1994). "Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein." Nature **369**(6480): 488-491.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.
- Harper, J. D. and P. T. Lansbury, Jr. (1997). "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins." Annual review of biochemistry **66**: 385-407.
- Hayashi, H., N. Kimura, et al. (2004). "A seed for Alzheimer amyloid in the brain." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **24**(20): 4894-4902.
- Heimann, R., M. L. Shelanski, et al. (1985). "Microtubule-associated proteins bind specifically to the 70-kDa neurofilament protein." The Journal of biological chemistry **260**(22): 12160-12166.
- Hein Nee Maier, K., A. Kohler, et al. (2008). "Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indicative for multiple sclerosis." Neuroscience letters **436**(1): 72-76.
- Henriquez, J. P., D. Cross, et al. (1995). "Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types." Cell biochemistry and function **13**(4): 239-250.
- Hernandez, F., J. Borrell, et al. (2002). "Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments." Journal of neurochemistry **83**(6): 1529-1533.

- Himmler, A., D. Drechsel, et al. (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): 1381-1388.
- Hirokawa, N., T. Funakoshi, et al. (1996). "Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons." The Journal of cell biology **132**(4): 667-679.
- Hirokawa, N., Y. Shiomura, et al. (1988). "Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules." The Journal of cell biology **107**(4): 1449-1459.
- Holmes, C., D. Boche, et al. (2008). "Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial." Lancet **372**(9634): 216-223.
- Hong, M., V. Zhukareva, et al. (1998). "Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17." Science **282**(5395): 1914-1917.
- Hopp, T. P., K. S. Prickett, et al. (1988). "A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification." Nat Biotech **6**(10): 1204-1210.
- Hsia, A. Y., E. Masliah, et al. (1999). "Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(6): 3228-3233.
- Hsieh, H., J. Boehm, et al. (2006). "AMPA removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss." Neuron **52**(5): 831-843.
- Hutton, M., C. L. Lendon, et al. (1998). "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17." Nature **393**(6686): 702-705.
- Hwang, S. C., D. Y. Jhon, et al. (1996). "Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid." J Biol Chem **271**(31): 18342-18349.
- Ikegami, S., A. Harada, et al. (2000). "Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice." Neuroscience letters **279**(3): 129-132.
- Iqbal, K., C. Alonso Adel, et al. (2008). "Cytosolic abnormally hyperphosphorylated tau but not paired helical filaments sequester normal MAPs and inhibit microtubule assembly." Journal of Alzheimer's disease : JAD **14**(4): 365-370.
- Iqbal, K., I. Grundke-Iqbal, et al. (1986). "Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease." Lancet **2**(8504): 421-426.
- Ishiguro, K., H. Ohno, et al. (1999). "Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease." Neuroscience letters **270**(2): 91-94.
- Ishihara, T., M. Hong, et al. (1999). "Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform." Neuron **24**(3): 751-762.
- Ittner, L. M., Y. D. Ke, et al. (2010). "Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models." Cell **142**(3): 387-397.
- Jeganathan, S., A. Hascher, et al. (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." J Biol Chem **283**(46): 32066-32076.
- Jenkins, S. M. and G. V. Johnson (1998). "Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ." Neuroreport **9**(1): 67-71.

- Jimenez-Jimenez, F. J., A. Hernanz, et al. (2005). "Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis." Acta neurologica Scandinavica **111**(2): 114-117.
- 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): 2056-2062.
- Johnson, G. V., R. S. Jope, et al. (1989). "Proteolysis of tau by calpain." Biochemical and biophysical research communications **163**(3): 1505-1511.
- Johnson, G. V., P. Seubert, et al. (1997). "The tau protein in human cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease consists of proteolytically derived fragments." Journal of neurochemistry **68**(1): 430-433.
- Kahle, P. J., M. Jakowec, et al. (2000). "Combined assessment of tau and neuronal thread protein in Alzheimer's disease CSF." Neurology **54**(7): 1498-1504.
- Kamada, Y., T. Funakoshi, et al. (2000). "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." The Journal of cell biology **150**(6): 1507-1513.
- Kamenetz, F., T. Tomita, et al. (2003). "APP processing and synaptic function." Neuron **37**(6): 925-937.
- Kanemaru, K., K. Takio, et al. (1992). "Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments." J Neurochem **58**(5): 1667-1675.
- Kar, S., J. Fan, et al. (2003). "Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol." The EMBO journal **22**(1): 70-77.
- Keck, S., R. Nitsch, et al. (2003). "Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease." Journal of neurochemistry **85**(1): 115-122.
- Kegel, K. B., M. Kim, et al. (2000). "Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **20**(19): 7268-7278.
- Kempf, M., A. Clement, et al. (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): 5583-5592.
- Kenessey, A., P. Nacharaju, et al. (1997). "Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration." Journal of neurochemistry **69**(5): 2026-2038.
- Kidd, M. (1963). "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." Nature **197**: 192-193.
- Kihara, M., E. Chatani, et al. (2005). "Seeding-dependent maturation of beta2-microglobulin amyloid fibrils at neutral pH." The Journal of biological chemistry **280**(12): 12012-12018.
- Kim, W., S. Lee, et al. (2010). "Secretion of human tau fragments resembling CSF-tau in Alzheimer's disease is modulated by the presence of the exon 2 insert." FEBS letters **584**(14): 3085-3088.
- Kim, W., S. Lee, et al. (2010). "Interneuronal transfer of human tau between Lamprey central neurons in situ." Journal of Alzheimer's disease : JAD **19**(2): 647-664.
- Kimberly, W. T., M. J. LaVoie, et al. (2003). "Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(11): 6382-6387.

- Kimberly, W. T., J. B. Zheng, et al. (2001). "The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner." The Journal of biological chemistry **276**(43): 40288-40292.
- Kimura, T., T. Ono, et al. (1996). "Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments." Dementia **7**(4): 177-181.
- Kiselyov, K., J. J. Jennigs, Jr., et al. (2007). "Autophagy, mitochondria and cell death in lysosomal storage diseases." Autophagy **3**(3): 259-262.
- Klionsky, D. J., H. Abeliovich, et al. (2008). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes." Autophagy **4**(2): 151-175.
- Klionsky, D. J., A. J. Meijer, et al. (2005). "Autophagy and p70S6 kinase." Autophagy **1**(1): 59-60; discussion 60-51.
- Knops, J., K. S. Kosik, et al. (1991). "Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes." The Journal of cell biology **114**(4): 725-733.
- Ko, D. C., L. Milenkovic, et al. (2005). "Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease." PLoS genetics **1**(1): 81-95.
- Komatsu, M., S. Waguri, et al. (2005). "Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice." The Journal of cell biology **169**(3): 425-434.
- Kosik, K. S., L. D. Orecchio, et al. (1989). "Developmentally regulated expression of specific tau sequences." Neuron **2**(4): 1389-1397.
- Kosik, K. S., L. D. Orecchio, et al. (1988). "Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments." Neuron **1**(9): 817-825.
- Kowall, N. W. and K. S. Kosik (1987). "Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease." Annals of neurology **22**(5): 639-643.
- Kuma, A., M. Hatano, et al. (2004). "The role of autophagy during the early neonatal starvation period." Nature **432**(7020): 1032-1036.
- Lace, G., G. M. Savva, et al. (2009). "Hippocampal tau pathology is related to neuroanatomical connections: an ageing population-based study." Brain : a journal of neurology **132**(Pt 5): 1324-1334.
- LaPointe, N. E., G. Morfini, et al. (2009). "The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity." J Neurosci Res **87**(2): 440-451.
- Lau, K. F., D. M. McLoughlin, et al. (2000). "X11 alpha and x11 beta interact with presenilin-1 via their PDZ domains." Molecular and cellular neurosciences **16**(5): 557-565.
- Lauckner, J., P. Frey, et al. (2003). "Comparative distribution of tau phosphorylated at Ser262 in pre-tangles and tangles." Neurobiology of aging **24**(6): 767-776.
- Leclerc, N., P. W. Baas, et al. (1996). "Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct patterns of process outgrowth." Molecular biology of the cell **7**(3): 443-455.
- Lee, G., S. T. Newman, et al. (1998). "Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases." Journal of cell science **111** (Pt 21): 3167-3177.
- Lee, V. M., B. J. Balin, et al. (1991). "A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau." Science **251**(4994): 675-678.
- Lee, V. M., M. Goedert, et al. (2001). "Neurodegenerative tauopathies." Annual review of neuroscience **24**: 1121-1159.
- Leger, J. G., R. Brandt, et al. (1994). "Identification of tau protein regions required for process formation in PC12 cells." Journal of cell science **107** (Pt 12): 3403-3412.

- Letierrier, J. F., R. K. Liem, et al. (1982). "Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: a possible mechanism for intraorganellar bridging." The Journal of cell biology **95**(3): 982-986.
- Leugers, C. J. and G. 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): 19125-19134.
- Levy-Lahad, E., W. Wasco, et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." Science **269**(5226): 973-977.
- Lewis, J., E. McGowan, et al. (2000). "Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein." Nature genetics **25**(4): 402-405.
- Liazoghli, D., S. Perreault, et al. (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.
- Lin, W. L., J. Lewis, et al. (2003). "Ultrastructural neuronal pathology in transgenic mice expressing mutant (P301L) human tau." Journal of neurocytology **32**(9): 1091-1105.
- 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): 5301-5305.
- Ling, Y., K. Morgan, et al. (2003). "Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease." The international journal of biochemistry & cell biology **35**(11): 1505-1535.
- 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): 1563-1568.
- Litersky, J. M. and G. V. Johnson (1995). "Phosphorylation of tau in situ: inhibition of calcium-dependent proteolysis." Journal of neurochemistry **65**(2): 903-911.
- Litman, P., J. Barg, et al. (1994). "Microtubules are involved in the localization of tau mRNA in primary neuronal cell cultures." Neuron **13**(6): 1463-1474.
- Litman, P., J. Barg, et al. (1993). "Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity." Neuron **10**(4): 627-638.
- Loomis, P. A., T. H. Howard, et al. (1990). "Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8422-8426.
- Lu, M. and K. S. Kosik (2001). "Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms." Molecular biology of the cell **12**(1): 171-184.
- Luna-Munoz, J., L. Chavez-Macias, et al. (2007). "Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease." Journal of Alzheimer's disease : JAD **12**(4): 365-375.
- Maas, T., J. Eidenmuller, et al. (2000). "Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments." The Journal of biological chemistry **275**(21): 15733-15740.
- Magnani, E., J. Fan, et al. (2007). "Interaction of tau protein with the dynactin complex." EMBO J **26**(21): 4546-4554.
- Mandelkow, E. M., K. Stamer, et al. (2003). "Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses." Neurobiology of aging **24**(8): 1079-1085.
- Manjithaya, R., C. Anjard, et al. (2010). "Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation." The Journal of cell biology **188**(4): 537-546.

- Masters, J. R. (2002). "HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly." Nature reviews. Cancer **2**(4): 315-319.
- Mattson, M. P., B. Cheng, et al. (1992). "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **12**(2): 376-389.
- Mattsson, N., H. Zetterberg, et al. (2009). "CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment." JAMA : the journal of the American Medical Association **302**(4): 385-393.
- Matus, A. (1994). "Stiff microtubules and neuronal morphology." Trends in neurosciences **17**(1): 19-22.
- Maurage, C. A., N. Sergeant, et al. (2003). "Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology." Acta neuropathologica **105**(2): 89-97.
- Mawal-Dewan, M., J. Henley, et al. (1994). "The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases." J Biol Chem **269**(49): 30981-30987.
- Melchior, F. and L. Gerace (1995). "Mechanisms of nuclear protein import." Current opinion in cell biology **7**(3): 310-318.
- Merk, M., J. Baugh, et al. (2009). "The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor." Journal of immunology **182**(11): 6896-6906.
- Mills, I. G., S. Urbe, et al. (2001). "Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion." Journal of cell science **114**(Pt 10): 1959-1965.
- Miranda, S., C. Opazo, et al. (2000). "The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease." Progress in neurobiology **62**(6): 633-648.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, et al. (2001). "Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells." The Journal of cell biology **152**(4): 657-668.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, et al. (2010). "Methods in mammalian autophagy research." Cell **140**(3): 313-326.
- Morfini, G., G. Pigino, et al. (2007). "Tau binding to microtubules does not directly affect microtubule-based vesicle motility." J Neurosci Res **85**(12): 2620-2630.
- Morgan, C., M. Colombres, et al. (2004). "Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease." Progress in neurobiology **74**(6): 323-349.
- Morishima-Kawashima, M., M. Hasegawa, et al. (1995). "Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau." J Biol Chem **270**(2): 823-829.
- Nakanishi, H., T. Amano, et al. (1997). "Increased expression of cathepsins E and D in neurons of the aged rat brain and their colocalization with lipofuscin and carboxy-terminal fragments of Alzheimer amyloid precursor protein." Journal of neurochemistry **68**(2): 739-749.
- Nakatogawa, H., K. Suzuki, et al. (2009). "Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast." Nature reviews. Molecular cell biology **10**(7): 458-467.
- Nelson, P. T., H. Braak, et al. (2009). "Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship." Journal of neuropathology and experimental neurology **68**(1): 1-14.

- Nelson, P. T., K. Stefansson, et al. (1996). "Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease." J Neurochem **67**(4): 1622-1632.
- Neve, R. L., P. Harris, et al. (1986). "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2." Brain research **387**(3): 271-280.
- Nickel, W. and C. Rabouille (2009). "Mechanisms of regulated unconventional protein secretion." Nature reviews. Molecular cell biology **10**(2): 148-155.
- Nixon, R. A., A. M. Cataldo, et al. (2000). "The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review." Neurochemical research **25**(9-10): 1161-1172.
- Nixon, R. A., J. Wegiel, et al. (2005). "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study." Journal of neuropathology and experimental neurology **64**(2): 113-122.
- Noda, T. and Y. Ohsumi (1998). "Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast." The Journal of biological chemistry **273**(7): 3963-3966.
- Noh, D. Y., S. H. Shin, et al. (1995). "Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling." Biochim Biophys Acta **1242**(2): 99-113.
- Nunan, J. and D. H. Small (2002). "Proteolytic processing of the amyloid-beta protein precursor of Alzheimer's disease." Essays in biochemistry **38**: 37-49.
- Osborne, A. R., T. A. Rapoport, et al. (2005). "Protein translocation by the Sec61/SecY channel." Annual review of cell and developmental biology **21**: 529-550.
- Palop, J. J. and L. Mucke (2010). "Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks." Nature neuroscience **13**(7): 812-818.
- 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): 210-226.
- Pelham, H. R. (2001). "SNAREs and the specificity of membrane fusion." Trends in cell biology **11**(3): 99-101.
- Perez, M., J. M. Valpuesta, et al. (1996). "Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction." Journal of neurochemistry **67**(3): 1183-1190.
- Perreault, S., O. Bousquet, et al. (2009). "Increased association between rough endoplasmic reticulum membranes and mitochondria in transgenic mice that express P301L tau." Journal of neuropathology and experimental neurology **68**(5): 503-514.
- Pijnenburg, Y. A., N. S. Schoonenboom, et al. (2004). "CSF tau and Abeta42 are not useful in the diagnosis of frontotemporal lobar degeneration." Neurology **62**(9): 1649.
- Piper, R. C. and D. J. Katzmann (2007). "Biogenesis and function of multivesicular bodies." Annual review of cell and developmental biology **23**: 519-547.
- Planel, E., P. Krishnamurthy, 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): 12798-12807.
- Poorkaj, P., T. D. Bird, et al. (1998). "Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia." Annals of neurology **43**(6): 815-825.
- Pope, W., S. A. Enam, et al. (1993). "Phosphorylated tau epitope of Alzheimer's disease is coupled to axon development in the avian central nervous system." Exp Neurol **120**(1): 106-113.

- Probst, A., J. Gotz, et al. (2000). "Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein." Acta neuropathologica **99**(5): 469-481.
- Qu, Y., L. Franchi, et al. (2007). "Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages." Journal of immunology **179**(3): 1913-1925.
- Rabouille, C. and J. Klumperman (2005). "Opinion: The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport." Nature reviews. Molecular cell biology **6**(10): 812-817.
- Rapoport, M., H. N. Dawson, et al. (2002). "Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(9): 6364-6369.
- Rendon, A., D. Jung, et al. (1990). "Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria." The Biochemical journal **269**(2): 555-556.
- Reynolds, C. H., C. J. Garwood, et al. (2008). "Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases." J Biol Chem **283**(26): 18177-18186.
- Riemenschneider, M., S. Wagenpfeil, et al. (2003). "Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias." Molecular psychiatry **8**(3): 343-347.
- Robakis, N. K., H. M. Wisniewski, et al. (1987). "Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome." Lancet **1**(8529): 384-385.
- Rogaev, E. I., R. Sherrington, et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." Nature **376**(6543): 775-778.
- Sabo, S. L., A. F. Ikin, et al. (2001). "The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement." The Journal of cell biology **153**(7): 1403-1414.
- Sabo, S. L., A. F. Ikin, et al. (2003). "The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **23**(13): 5407-5415.
- Saman, S., W. Kim, et al. (2011). "Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid (CSF) in early Alzheimer's Disease." The Journal of biological chemistry.
- Santacruz, K., J. Lewis, et al. (2005). "Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function." Science **309**(5733): 476-481.
- Saraste, J., G. E. Palade, et al. (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): 6425-6429.
- Sato, S., Y. Tatebayashi, et al. (2002). "Aberrant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells." J Biol Chem **277**(44): 42060-42065.
- Savina, A., M. Furlan, et al. (2003). "Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells." The Journal of biological chemistry **278**(22): 20083-20090.
- Sawa, A., F. Oyama, et al. (1994). "Molecular diversity at the carboxyl terminus of human and rat tau." Brain Res Mol Brain Res **27**(1): 111-117.

- Schraen-Maschke, S., C. M. Dhaenens, et al. (2004). "Microtubule-associated protein tau gene: a risk factor in human neurodegenerative diseases." Neurobiology of disease **15**(3): 449-460.
- Schraen-Maschke, S., N. Sergeant, et al. (2008). "Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases." Biomarkers in medicine **2**(4): 363-384.
- Schroer, T. A. (2004). "Dynactin." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 759-779.
- Sciaky, N., J. Presley, et al. (1997). "Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells." The Journal of cell biology **139**(5): 1137-1155.
- Seitz, A., H. Kojima, et al. (2002). "Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c." EMBO J **21**(18): 4896-4905.
- Sengupta, A., J. Kabat, et al. (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.
- Serrano, L., E. Montejó de Garcini, et al. (1985). "Localization of the tubulin binding site for tau protein." European journal of biochemistry / FEBS **153**(3): 595-600.
- Settembre, C., A. Fraldi, et al. (2008). "A block of autophagy in lysosomal storage disorders." Human molecular genetics **17**(1): 119-129.
- Shankar, G. M., B. L. Bloodgood, et al. (2007). "Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **27**(11): 2866-2875.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**(6534): 754-760.
- Siman, R., T. K. McIntosh, et al. (2004). "Proteins released from degenerating neurons are surrogate markers for acute brain damage." Neurobiology of disease **16**(2): 311-320.
- Sinha, S., J. P. Anderson, et al. (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." Nature **402**(6761): 537-540.
- Small, S. A. and K. Duff (2008). "Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis." Neuron **60**(4): 534-542.
- Sontag, E., A. Luangpirom, et al. (2004). "Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β 1C enzyme are associated with Alzheimer disease pathology." Journal of neuropathology and experimental neurology **63**(4): 287-301.
- Spillantini, M. G. and M. Goedert (1998). "Tau protein pathology in neurodegenerative diseases." Trends in neurosciences **21**(10): 428-433.
- Spittaels, K., C. Van den Haute, et al. (1999). "Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein." The American journal of pathology **155**(6): 2153-2165.
- Stamer, K., R. Vogel, et al. (2002). "Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress." J Cell Biol **156**(6): 1051-1063.
- Steinhilb, M. L., D. Dias-Santagata, et al. (2007). "Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo." Molecular biology of the cell **18**(12): 5060-5068.
- Storey, E., T. Spurck, et al. (1996). "The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites." Brain research **735**(1): 59-66.
- Takasugi, N., T. Tomita, et al. (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." Nature **422**(6930): 438-441.

- Takei, Y., J. Teng, et al. (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.
- Tanudji, M., S. Hevi, et al. (2002). "Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway." Journal of cell science **115**(Pt 19): 3849-3857.
- Tartaglia, M. C., H. J. Rosen, et al. (2011). "Neuroimaging in dementia." Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics **8**(1): 82-92.
- Tatebayashi, Y., T. Miyasaka, et al. (2002). "Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(21): 13896-13901.
- Taupenot, L. (2007). "Analysis of regulated secretion using PC12 cells." Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.] **Chapter 15**: Unit 15 12.
- Thurston, V. C., R. P. Zinkowski, et al. (1996). "Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo." Chromosoma **105**(1): 20-30.
- Utton, M. A., W. J. Noble, et al. (2005). "Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein." Journal of cell science **118**(Pt 20): 4645-4654.
- Vanderstichele, H., K. De Vreese, et al. (2006). "Analytical performance and clinical utility of the INNOTEST PHOSPHO-TAU181P assay for discrimination between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies." Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC **44**(12): 1472-1480.
- Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." Science **286**(5440): 735-741.
- Vershinin, M., B. C. Carter, et al. (2007). "Multiple-motor based transport and its regulation by Tau." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 87-92.
- von Blume, J., J. M. Duran, et al. (2009). "Actin remodeling by ADF/cofilin is required for cargo sorting at the trans-Golgi network." The Journal of cell biology **187**(7): 1055-1069.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." Nature **416**(6880): 535-539.
- Wang, X., J. Matteson, et al. (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.
- Wang, Y., P. A. Loomis, et al. (1993). "A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau." J Cell Biol **121**(2): 257-267.
- Wang, Y., M. Martinez-Vicente, et al. (2009). "Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing." Human molecular genetics **18**(21): 4153-4170.
- Watanabe, A., M. Hasegawa, et al. (1993). "In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau." J Biol Chem **268**(34): 25712-25717.
- Wei, Y., M. H. Qu, et al. (2008). "Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation." PLoS One **3**(7): e2600.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, et al. (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72**(5): 1858-1862.

- Wilson, D. M. and L. I. Binder (1997). "Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease." The American journal of pathology **150**(6): 2181-2195.
- Wischik, C. M., M. Novak, et al. (1988). "Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(12): 4506-4510.
- Witman, G. B., D. W. Cleveland, et al. (1976). "Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **73**(11): 4070-4074.
- Wittmann, C. W., M. F. Wszolek, et al. (2001). "Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles." Science **293**(5530): 711-714.
- Xie, Z. and D. J. Klionsky (2007). "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." Nature cell biology **9**(10): 1102-1109.
- Yamaguchi, H., S. Hirai, et al. (1988). "A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer-type dementia demonstrated by beta protein immunostaining." Acta neuropathologica **76**(6): 541-549.
- Yamazaki, T., E. H. Koo, et al. (1997). "Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **17**(3): 1004-1010.
- Yan, R., M. J. Bienkowski, et al. (1999). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." Nature **402**(6761): 533-537.
- Yanagisawa, K. (2005). "GM1 ganglioside and the seeding of amyloid in Alzheimer's disease: endogenous seed for Alzheimer amyloid." The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry **11**(3): 250-260.
- 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 / FEBS **233**(1): 9-17.
- Yuan, A., A. Kumar, et al. (2008). "Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice." J Neurosci **28**(7): 1682-1687.
- Zheng, H. and E. H. Koo (2006). "The amyloid precursor protein: beyond amyloid." Molecular neurodegeneration **1**: 5.

