

UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

Discipline : Neurosciences

Romain Perbet

Rôle des vésicules extracellulaires dans la propagation de la protéine Tau

Soutenue publiquement le 4 décembre 2020 devant le jury composé de :

Docteur Luc BUEE

Professeur Claire PAQUET

Docteur Stéphane HAIK

Docteur Kévin RICHETIN

Docteur Morvane COLIN

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

Remerciements

Je remercie les membres du jury de cette thèse :

En premier lieu, Monsieur Luc Buée, qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Je vous remercie pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe, soutenu tout au long de mon travail de thèse. Votre implication scientifique et humaine au sein de l'équipe suscite mon profond respect.

Je remercie Madame Claire Paquet et Monsieur Stéphane Haïk qui ont accepté d'être jurys et rapporteurs de cette thèse et qui ont suivi ce travail durant ces trois ans.

Merci à Monsieur Kévin Richetin, qui a accepté avec entrain de participer à mon jury de thèse. Je suis très honorée de ta présence dans ce jury. Je te remercie également pour le travail que tu fais dans nos travaux collaboratifs, qui je l'espère se poursuivront.

Je tiens à remercier très chaleureusement Madame Morvane Colin qui m'a encadré pour ce projet. Merci pour la confiance que vous m'accordez, pour votre enthousiasme, pour votre disponibilité, votre patience et votre gentillesse.

Je remercie Monsieur Claude-Alain Maurage pour avoir accepté que je mène ce projet en parallèle de mon assistantat et pour son soutien au quotidien dans mon parcours professionnel.

Je remercie toute l'équipe Alzheimer et tauopathies. Je remercie plus particulièrement Elodie Leroux, Sarah Lieger, Raphaëlle Caillièrez, Séverine Begard et Thomas Bouillet pour leur aide très précieuse et leur soutien.

Je remercie Nathalie Jouy pour son aide en cytométrie en flux et le Meriem Tardyvel et Antonino Bongiovanni pour leur aide en microscopie confocale.

Je remercie mes collègues de l'Institut de Pathologie pour leur soutien.

Merci à Jean le Baptiste, Romain et Morgane pour leur soutien et leur amitié.

Je remercie ma famille. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Merci à mes parents, pour leur aide, leur soutien et leur confiance dans mes choix. Merci à ma sœur et Nicolas pour son soutien. Merci à Marie-Claude, Jean-Louis et Arlette pour leur soutien.

Merci à Fanny.

Table des matières

INTRODUCTION

I.	Protéine Tau et tauopathies.....	- 3 -
A.	La paralysie supranucléaire progressive	- 5 -
B.	La maladie de Pick (PiD)	- 5 -
C.	La maladie d'Alzheimer	- 5 -
II.	Agrégation de Tau avec des propriétés de type prion	- 7 -
A.	Propriétés des Prions.....	- 9 -
B.	Hypothèse Prion-like de Tau	- 11 -
III.	Transmissibilité de la pathologie Tau, nucléation	- 13 -
IV.	Mécanismes de propagation de la protéine Tau.....	- 14 -
V.	Les espèces pathologiques de Tau qui se propagent	- 14 -
VI.	Voies de transfert de cellules à cellules (figure 6).....	- 16 -
A.	Mécanisme de sécrétion de Tau :	- 16 -
1.	Sécrétion de Tau libre (extravésiculaire).....	- 17 -
a.	Sécrétion directement à travers la membrane plasmique.....	- 17 -
b.	Sécrétion à partir d'endo-lysosomes.....	- 17 -
2.	Sécrétion de Tau dans des vésicules extracellulaires (VE)	- 18 -
3.	Les espèces de protéines Tau sécrétées	- 21 -
B.	Mécanismes d'internalisation de Tau	- 21 -
C.	Nanotubes	- 22 -
VII.	Types cellulaires impliqués dans la propagation de Tau	- 22 -
A.	Les astrocytes	- 23 -
1.	Mécanismes de clairance	- 23 -
2.	Homéostasie cérébrale.....	- 24 -
B.	Tau et glie	- 24 -
1.	Implication de la glie dans la propagation de l' α -synucléine et les maladies à prion.....	- 25 -
2.	Implication des astrocytes dans la propagation de Tau.....	- 26 -

OBJECTIFS

MATERIELS ET METHODES

I.	Matériels.....	- 28 -
A.	Anticorps utilisés	- 28 -
B.	Animaux.....	- 28 -
C.	Echantillons humains.....	- 28 -
1.	Tissu cérébral humain utilisé pour l'extraction de l'ISF et la quantification des lésions ..	- 28 -

2.	LCR et plasmas (or cohorte ecTAUsome)	- 29 -
3.	Cohorte EcTAUsome.....	- 29 -
a.	Critères d'exclusion :	- 29 -
b.	Critères d'inclusion communs :	- 30 -
c.	Critères d'inclusions spécifiques aux groupes :.....	- 30 -
Tableau 2 : groupes de la cohorte ecTAUsome et critères d'inclusion spécifiques aux groupes		- 30 -
II.	Méthodes	- 31 -
A.	Extraction du liquide interstitiel cérébral.....	- 31 -
B.	Caractérisation des vésicules extracellulaires murines et humaines.....	- 31 -
1.	Fractionnement vésiculaire par chromatographie d'exclusion de taille.....	- 31 -
2.	Analyse des vésicules par diffusion de lumière (NTA, nanoparticules tracking analysis). -	31 -
3.	Microscopie électronique.....	- 32 -
4.	Western-blot	- 32 -
5.	Colorations à l'argent de gels de protéines.....	- 32 -
C.	Détection d'espèces toxiques de tau dans les vésicules extracellulaires murines et humaines . -	33 -
1.	<i>In-vitro</i>	- 33 -
a.	Culture des lignées cellulaires	- 33 -
b.	Test cellulaire de recrutement e tau (FRET)	- 33 -
c.	Production des fibres recombinantes K18	- 34 -
2.	<i>In-vivo</i>	- 34 -
a.	Injections stéréotaxiques	- 34 -
b.	Sacrifice des animaux et procédures de préparation des tissus	- 35 -
c.	Immunohistochimie (IHC) sur coupes flottantes et quantification du marquage	- 35 -
D.	Immunohistochimie (IHC) sur tissus humains et quantification du marquage.....	- 35 -
E.	Transfert de protéine Tau de neurone à astrocyte	- 36 -
1.	Culture primaire d'astrocytes :.....	- 36 -
2.	Culture primaire de neurones :	- 36 -
3.	Infection par vecteur lentiviral	- 36 -
4.	Culture en chambre microfluidique	- 36 -
5.	Microscopie confocale	- 37 -
6.	Transfert des fractions enrichies en ectosomes, exosomes et Tau libre à partir du milieu conditionné	- 38 -
7.	Spectrométrie de masse (MS).	- 38 -
8.	ELISA	- 38 -
9.	Analyse en qPCR.....	- 38 -

a.	Extraction des ADNs totaux.....	- 38 -
b.	PCR quantitative	- 39 -
10.	Analyses statistiques	- 39 -

RESULTATS

I.	Les vésicules extracellulaires comportent-elles de la protéine Tau ayant un potentiel de recrutement ?.....	- 41 -
A.	Caractérisation des fractions enrichies en VE :	- 41 -
1.	Analyse par suivi des nanoparticules (Nanosight) :.....	- 41 -
2.	Dosage protéique	- 43 -
3.	Analyse par colorations à l'argent des gels de protéines.....	- 44 -
4.	Analyse de la morphologie des VE en microscopie électronique	- 45 -
5.	Analyse par Western-blot.....	- 45 -
B.	Les VE extraites de l'ISF cérébral contiennent des espèces comportant des propriétés de recrutement.	- 46 -
1.	Les VE extraites de l'ISF cérébral de souris Tg30tau ont la capacité de recruter Tau.....	- 46 -
2.	Les capacités de recrutement de VE extraites de l'ISF cérébral de patients dépendent de la Tauopathie dont ils sont atteints	- 49 -
3.	Les capacités de recrutement de VE extraites de l'ISF cérébral ne dépendent pas du délai <i>post mortem</i>	- 52 -
C.	Les VE extraites de l'ISF de cerveaux de patients atteints de MA induisent de la pathologie in-vivo -	52 -
D.	VE de LCR et de plasma humains et potentiel de recrutement	- 53 -
II.	Variation de la sécrétion de VE dans le LCR et le plasma au cours de la MA.....	- 55 -
III.	Existe-t-il un transfert de Tau de neurones à astrocytes ?.....	- 57 -
A.	Transfert de Tau de neurones à astrocytes : étude en chambres microfluidiques.....	- 57 -
B.	Voies de transfert de la protéine Tau de neurones à astrocytes	- 59 -
1.	Caractérisation des fractions enrichies en VE	- 59 -
a.	Quantification des particules par NTA	- 59 -
b.	Spectrométrie de masse.....	- 60 -
c.	Les fractions enrichies en VE ne comportent pas de particules virales résiduelles	- 61 -
2.	Mode de transfert de la protéine Tau neurones-astrocytes.....	- 62 -
DISCUSSION		
I.	Fractionner les fractions... pour mieux les comprendre l'origine des VE.....	- 65 -
II.	La vulnérabilité neuronale, une piste pour expliquer les différences entre les Tauopathies... -	66 -
III.	Le transport des VE est-il synaptique ou extra-synaptique ?.....	- 68 -
IV.	Le modèle biosenseur utilisé est-il capable de mesurer les capacités de recrutement ?.....	- 68 -

V. Gradient de Tau pathologique du LCR-V au LCR-PL	- 69 -
VI. Que deviennent les espèces pathologiques de Tau identifiées dans le LCR ventriculaire ?	- 70 -
VII. Les voies de transfert de protéines Tau de neurones à astrocytes.....	- 71 -
VIII. Rôle du transfert de Tau de neurones à astrocytes	- 71 -

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABSTRACT

Intra-neuronal accumulation of tau protein aggregates is one of the common feature of a group of heterogeneous neurodegenerative diseases called tauopathies. In some of them, the pathology will first affect a region before spreading to other regions.

This staging could be linked to the prion-like propagation of pathological seed-competent tau species. These seeds, identified in transgenic mice interstitial fluid (ISF) and in human cerebrospinal fluid (CSF) are uptaken by cells and induce subsequent intracellular tau aggregation (Takeda *et al.*, 2016). The pathological species of tau which are spreading are not yet well characterized but several mechanisms mediating their transfer (secretion and capture) have been highlighted. Among them, we demonstrated that tau is secreted in extracellular vesicles (EV's) (Dujardin *et al.*, 2014). We also know that neurons are implicated in this transfer but the role of glial cells is unknown.

In this context, we wanted to: 1 / demonstrate that pathological Tau protein is present in EVs extracted from brain of patients suffering from different Tauopathy and that those EVS induce pathology in animals. 2 / detect pathological Tau species in EVs extracted from plasma and CSF, potential biomarkers of Tauopathies. 3 / demonstrate that Tau protein can be transferred from neuron to astrocyte and, if so, to determine the transfer pathway.

To test the seeding potential of EV's containing in ISF derived from human brain of patient presenting tauopathies, and Tau 30 mouse brain we have used a sensitive and specific tau biosensor assay. Our results demonstrate that **EVs isolated from ISF of AD patient, PSP patient and Tau 30 mouse contain seed prion-like properties**. The ability of these seeds to recruit tau seems to be correlated to the severity of tau pathology (prefrontal>occipital>cerebellum) for AD. This might reflect the slight presence of neurofibrillary degeneration as well as extracellular tau in this pathology in comparison to AD. Finally, the presence of seeds-containing EV's in the extracellular space supports the idea that these shuttles might be implied in the prion-like propagation of tau pathology in Humans. Additionally, tau pathology spreading is driven by EV's rather than by free-floating tau species.

We also demonstrated that tau can be transferred from neuron to astrocyte; this transfer is more efficient with EV's than with free floating tau.

These data open new avenues for therapeutic interventions that might targets the toxic and propagative species.

RESUME

L'agrégation de tau intra-neuronale est une caractéristique commune d'un groupe hétérogène de maladies neurodégénératives appelées tauopathies. Dans certaines d'entre elles, la pathologie affecte une région cérébrale avant de se propager à d'autres régions.

Cette évolution stéréotypée dans le temps et dans l'espace est probablement liée à une propagation de type prion d'espèces de tau ayant des propriétés de recrutement. Ces espèces pathologiques de tau identifiées dans le liquide interstitiel cérébral (ISF) de souris transgéniques et dans le liquide céphalorachidien humain (LCR) peuvent être internalisées par des cellules et induire une agrégation intracellulaire de tau (Takeda et al., 2016). Ces espèces pathologiques sont encore mal caractérisées mais plusieurs mécanismes potentiellement impliqués dans leur propagation ont été démontrés. Parmi eux nous avons démontré que tau est sécrétée dans les vésicules extracellulaires (EV) (Dujardin et al., 2014).

Dans ce contexte nous avons voulu : 1/ vérifier l'hypothèse selon laquelle la protéine Tau pathologique est présente dans les VE extraites de tissus de patients atteints de différentes Tauopathies et que ces dernières peuvent induire de la pathologie chez l'animal. 2/ détecter des espèces pathologiques de Tau dans les VE contenues dans le plasma et le LCR, potentiels biomarqueurs de Tauopathies. 3/déterminer si de la protéine Tau peut être transférée d'un neurone à un astrocyte et dans le cas échéant, de déterminer la/les voies de transfert.

Afin de tester la présence de tau avec potentiel de recrutement dans les EV extraites d'ISF de patients atteints de tauopathie set de souris transgéniques nous avons utilisé un biosenseur biologique sensible et spécifique. Nos résultats démontrent que **des EV extraites d'ISF de patients atteints de maladie d'Alzheimer, de paralysie supranucléaire progressive (PSP) et de souris Tau30 contiennent de la tau pro-nucléantes**. Ces capacités de recrutement sont corrélées à la sévérité de la pathologie pour la MA (préfrontal>occipital>cervelet) et induisent de la pathologie chez la souris transgénique. La présence de tau dans ces VE supporte l'idée que les EV pourraient avoir un rôle dans la propagation de tau.

Nous avons également démontré par différentes approches in-vitro que la protéine Tau peut être transférée de neurone à astrocyte. Ce transfert se fait principalement par les vésicules extracellulaires.

INTRODUCTION

La majorité des maladies neurodégénératives se caractérisent par des dépôts protéiques constitués par l'assemblage pathologique, en filaments, de protéines physiologiquement solubles. Les Tauopathies, caractérisées par l'agrégation de protéine Tau sont les protéinopathies les plus fréquentes du système nerveux humain. Parmi elles, les plus courantes sont : la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Pick (PiD), l'encéphalopathie post traumatismes chroniques (CTE), la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence corticobasale (DCB) et la maladie à grains argyrophiles (AGD). Les agrégats de Tau sont majoritairement intraneuronaux (dégénérescences neurofibrillaires dans la MA par exemple), mais peuvent également être intragliaux (astrocytes en touffes, plaques astrocytaires dans PSP et la DCB ou corps bobinés dans les oligodendrocytes...)(1). Dans certaines de ces Tauopathies, la protéine Tau n'est pas la seule à s'agréger. Par exemple, dans la MA, il existe en plus des agrégats de Tau, des agrégats de peptide β -amyloïde. La présence d'agrégats de divers types dans une même maladie fait s'interroger sur le rôle physiopathologique de chacun des types d'agrégats. En effet, la présence de mutations dans le gène codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), chez des patients atteints de MA précoces, laissait penser que la pathologie β -amyloïde était le *primum movens* de la MA ; l'agrégation de Tau était considérée comme un épiphénomène (2–4). Quelques années plus tard, la découverte de mutations germinales dans le gène *MAPT* codant pour Tau chez des patients atteints de démences fronto-temporales héréditaires a permis de confirmer que la protéine Tau avait un rôle central, au moins dans certaines Tauopathies.

I. Protéine Tau et tauopathies

La protéine Tau a été découverte comme étant une protéine essentielle à l'assemblage des microtubules en 1975 par Weingarten et collaborateurs (5). Elle est nommée Tau en raison de son interaction avec la tubuline. Le développement d'anticorps monoclonaux et de techniques immunohistochimiques, a permis de mettre en évidence en 1985 que cette protéine est le composant majeur des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) caractéristiques de la MA mais aussi des agrégats présents dans la PSP et la maladie de Pick (PiD) (6–12).

Cette protéine dont le rôle essentiel est de stabiliser les microtubules, est essentiellement présente dans l'axone des neurones du système nerveux central et du système nerveux périphérique (13).

Elle est constituée de plusieurs régions : la région N-terminale, riche en proline, un domaine de répétition associé aux microtubules et une région C-terminal (Figure 1c). La région N-terminale se projette à la surface des microtubules. La cryo-microscopie électronique (cryoEM) a permis de mettre en évidence que chaque répétition située dans le domaine de répétition se lie à la surface externe du microtubule interagissant avec l' α - et la β -tubuline (14,15). Le rôle de la région C-terminale est moins connu.

Le gène *MAPT* codant pour Tau est constitué de 16 exons. Il existe 6 isoformes de Tau coexprimées dans le cerveau humain normal : 3 isoformes comportent 3 domaines de liaison aux microtubules (3R) et 3 isoformes comportent 4 domaines de liaison aux microtubules (4R)

(16) (Figure 1c). Du point de vue physiologique, l'expression des isoformes de Tau varie avec l'âge. L'isoforme 1N3R hyperphosphorylée est très exprimée dans les neurones de cerveaux en développement alors que les isoformes 4R sont plus exprimées dans les neurones de cerveaux adultes.

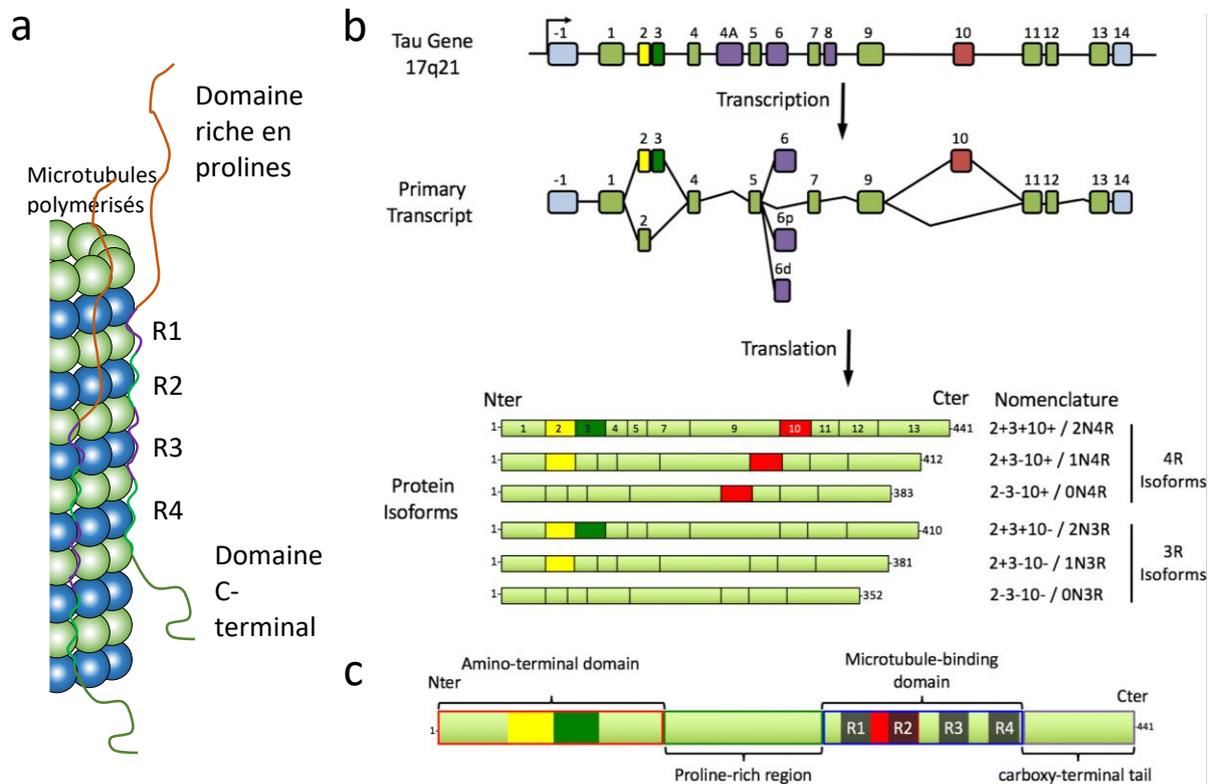


Figure 1 : Tau, fonction, gène et protéine

a : Tau est encrée à la jonction entre les dimères α -tubuline/ β -tubuline, et favorise ainsi la stabilité des dimères de tubuline. **b** : Représentation schématique du gène *MAPT*, de ses transcrits et des 6 isoformes protéiques exprimées dans le cerveau humain. Le gène *MAPT* codant pour Tau est constitué de 16 exons. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs, tandis que les exons 2, 3, 6 et 10 sont alternatifs. L'exon 3 n'apparaît jamais indépendamment de l'exon 2. Les exons 1 et 14 sont présents dans l'ARNm, mais ne sont jamais traduits. Six transcrits principaux sont présents dans le cerveau adulte: 2 - 3 - 10 - ou 0N3R; 2 + 3 - 10 - ou 1N3R; 2 + 3 + 10 - ou 2N3R; 2 - 3 - 10 + ou 0N4R; 2 + 3 - 10 + ou 1N4R; 2 + 3 + 10 + ou 2N4R. A la naissance, une seule isoforme est présente, il s'agit de l'isoforme foétale (2-, 3-, 10-). Les autres isoformes apparaîtront en post-natal. On distingue ainsi de haut en bas sur la figure 1b les isoformes 2N4R, 1N4R, 0N4R, 2N3R, 1N3R et 0N3R. **c** : La protéine Tau est constituée de quatre domaines aux propriétés biochimiques différentes : une région amino-terminale acide (correspondant à l'expression des exons 1-5), un domaine riche en proline (correspondant à l'expression des exons 7 et 9), le domaine de liaison aux microtubules avec quatre séquences répétées (R1 – R4) et une queue carboxy-terminale (exon 13) (Colin et al. 2020 D'après Sergeant et al., 2008).

Dans les Tauopathies, la protéine Tau s'agrège sous forme d'inclusions fibrillaires (17). L'assemblage de cette protéine soluble sans structure stable sous forme de monomères, se fait sous forme de filaments amyloïdes dont la structure est d'une grande stabilité.

En pathologie, les différentes Tauopathies se différencient, entre autres, par la morphologie des inclusions de Tau, mais aussi par leur distribution. Une des raisons pouvant expliquer ces différences est la composition des inclusions. Dans la MA, les 6 isoformes de Tau (isoformes 3R et 4R) se déposent principalement dans les neurones. Dans la PiD, seule l'isoforme 3R se

dépose sous forme de corps de Pick intraneuronaux. Dans la PSP et la CBD, les isoformes 4R se déposent dans les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. Cependant, cette différence 3R/4R ne permet pas d'expliquer toutes les différences observées à la fois du point de vue clinique mais aussi neuropathologique dans les Tauopathies. Par exemple, la distribution des dépôts de Tau, leur morphologie et les symptômes cliniques sont différents entre la PSP et la CBD, deux Tauopathies dites « 4R » (tableau 1). Que les agrégats soient composés d'isoformes 3R ou 4R de Tau, la structure globale des agrégats est toujours similaire : le domaine de répétition et certaines séquences adjacentes forment le noyau de l'inclusion sous forme de feuillettes β -plissées (18,19), la moitié N-terminale et l'extrémité C-terminale composant la périphérie (20–22). Il existe néanmoins des différences ultrastructurales des filaments de Tau dans les différentes Tauopathies (19,23,24). En effet, la partie centrale, encore appelée noyau ou corps, très condensée et résistante à la digestion par la trypsine, est composée de différents domaines de répétition situés entre les résidus 243–406, et sa conformation est considérée comme spécifique à la maladie (25). Ces motifs rappellent ceux qui ont été décrits dans les maladies à prion humaines (16).

A. La paralysie supranucléaire progressive

La PSP est une maladie neurodégénérative sporadique de l'adulte classée comme une Tauopathie 4R pure. Du point de vue neuropathologique, la PSP est caractérisée par la présence d'inclusions de protéines Tau dans trois types de cellules : des inclusions neuronales, les astrocytes en touffes (TA) et les corps bobinés (oligodendrogliaux) (figure 2d et 2f). Les lésions neuronales comprennent des inclusions globuleuses et des DNF proches de celles vues dans la MA. Les astrocytes en touffes sont en revanche assez spécifiques de la PSP. Il s'agit d'inclusions Tau-positives formant des touffes autour des noyaux jusqu'à l'extrémité des prolongements cytoplasmiques. Ils sont principalement localisés dans le striatum et le cortex frontal (26,27). Les dépôts neuronaux, astrocytaires et oligodendrogliaux atteignent les différentes aires cérébrales selon une séquence différente de celle des neurones (28,29) (tableau 1). Même si la charge globale en dépôts de protéines Tau est corrélée à la déficience cognitive, la contribution spécifique des lésions gliales ou neuronales n'est pas connue (30). De plus, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la distribution des lésions astrocytaires et neuronales (Ito et al., 2008), ce qui suggère que les astrocytes en touffes ne se forment pas nécessairement secondairement aux DNF (31).

B. La maladie de Pick (PiD)

La PiD est une sous catégorie de démence frontotemporale, caractérisée du point de vue neuropathologique par une atrophie frontale et temporale sévère et des inclusions intraneuronales sphériques constituées de protéine Tau 3R appelés corps de Pick (figure 2c). Du point de vue clinique elle se caractérise par un syndrome frontal et des troubles du langage.

C. La maladie d'Alzheimer

La MA se caractérise une atteinte précoce de l'hippocampe et des zones temporales, expliquant que le premier signe d'une maladie de type Alzheimer est souvent la perte de mémoire (particulièrement la mémoire de travail et la mémoire épisodique), suivie par l'aphasie, l'agnosie et l'apraxie. Plus tardivement, quand les aires frontales sont atteintes, apparaissent des troubles comportementaux. Du point de vue neuropathologique les dépôts protéiques

peuvent être classés dans 2 catégories : la pathologie neurofibrillaire et les les dépôts de peptide A β . La première comprend les dégénérescences neurofibrillaires, la couronne des plaques séniles et les fibres tortueuses (« neuropil threads ») (figure 2b). Les dépôts amyloïdes, observés dans le centre de la plaque sénile dont ils forment le coeur et dans la paroi des vaisseaux, sont constitués de peptide A β .

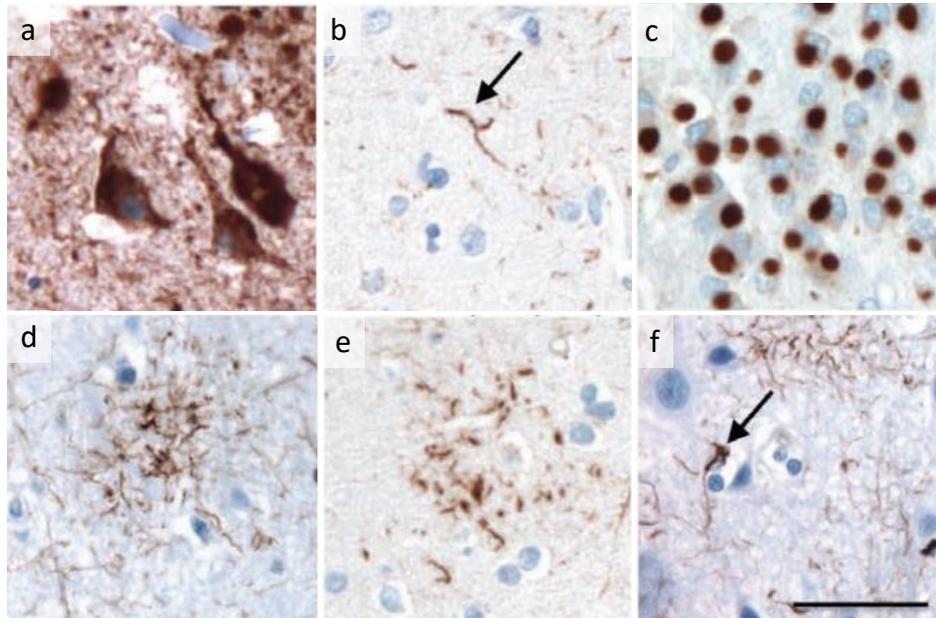


Figure 2 : Lésions neuropathologiques de différentes tauopathies

Marquages immunohistochimiques avec l'anticorps anti-TAU (AT8) **a/** Dégénérescences neurofibrillaires observées dans la CA1 d'un patient atteint de MA. **b/** fibre tortueuse dans le cortex frontal (BA8/9) d'un patient atteint de MA. **c/**corps de Pick observés dans le gyrus denté d'un patient atteint de maladie de Pick. **d/** astrocyte en touffe dans le cortex frontal (BA8/9) d'un patient atteint de PSP. **e/**plaque astrocytaire dans le cortex frontal (BA8/9) d'un patient atteint de DCB. **f/**corps bobiné dans le cortex frontal (BA8/9) d'un patient atteint de DCB. Barre d'échelle = 50 μ m

Tableau 1 : Principales Tauopathies étudiées dans ce travail avec description succincte des symptômes cliniques, et des caractéristiques neuropathologiques

Maladie	Familial/ sporadique	Principales régions cérébrales atteintes	Symptômes cliniques	Inclusions neuronales	Autres inclusions	Année de description	Ref.
Alzheimer	F/S	Cortex entorhinal, hippocampe, puis toutes les aires corticales	Troubles cognitifs (mémoire épisodique et de travail au premier plan) du langage et de l'orientation. Apraxie.	Tau 3R/4R. dégénérescences neurofibrillaires (DNF), neurites, plaques neuritiques	Plaques séniles (A- β), inclusions TDP-43, corps d'Hirano, inclusions Tau gliales diverses	1906	(32)
PSP	S	Très variable. Atrophie frontale postérieure, gyrus pré-central	Troubles oculomoteurs, syndrome parkinsonien	Tau 4R. inclusions en forme de flamme, DNF, inclusions sphériques neurites	Corps bobinés, astrocytes en touffes	1904 (Steele-Richardson-Olszewski)	(28,33)
PiD	F/S	Frontal et temporal	Troubles du langage, syndrome frontal	Tau 3R. Corps de Pick	Inclusions gliales diverses	1892	(34)

II. Agrégation de Tau avec des propriétés de type prion

Pendant plusieurs décennies, il a été admis que les agrégats de Tau étaient secondaires à des phénomènes passifs et responsables de la mort neuronale. Actuellement, les causes de l'agrégation de Tau ne sont pas encore complètement élucidées. Néanmoins, l'étude des Tauopathies avec mutation du gène MAPT a ouvert de nouvelles pistes mécanistiques. En effet, il existe une soixantaine de mutations de MAPT induisant la FTDP-17, dont la majorité se trouve dans les exons 9 à 12 (codant pour les domaines répétés de liaison aux microtubules) ou dans l'intron précédant l'exon 10. Ces mutations ont des effets divers : certaines ont une action directe sur la protéine en modifiant la concentration intracellulaire de Tau, et/ou ses interactions avec les microtubules, (35) et/ou ont un pouvoir pro-agrégant (36,37) ; d'autres agissent sur le niveau de la traduction et/ou sur l'épissage, modifiant le ratio 3R/4R. En fonction de la mutation de MAPT, le ratio 3R/4R et la morphologie des fibrilles sont différents (38).

D'autres pistes sont étudiées concernant les causes de l'agrégation de Tau dans les Tauopathies sporadiques. Tau étant une protéine hydrophile, il n'est pas surprenant que son agrégation soit conditionnée par des cofacteurs tels que des glycosaminoglycanes sulfatés, des acides nucléiques ou des acides gras, pour s'assembler en filaments (39–42). Récemment, il a d'ailleurs été décrit pour la Tau totale, une phase de séparation liquide/liquide, modifiée par la concentration de Tau et de cofacteurs, induisant possiblement son agrégation (43). Certaines modifications post-traductionnelles favorisent également l'agrégation de Tau : il s'agit principalement de la phosphorylation ; le rôle de l'acétylation est plus controversé et il semble qu'en fonction des résidus acétylés l'effet puisse être pro ou anti-agrégatif (44–47).

Bien que l'origine de l'agrégation de Tau soit encore à élucider, des preuves se sont accumulées depuis 2009, suggérant que les assemblages pathologiques de la protéine Tau se formeraient d'abord en petit nombre dans quelques neurones, puis se propageraient vers d'autres cellules et d'autres régions cérébrales (48,49). En effet, dans plusieurs Tauopathies (MA, PSP, AGD, PiD), l'évolution des lésions anatomopathologiques stéréotypées dans le temps et dans l'espace, a conduit à l'hypothèse qu'il pourrait exister une propagation de protéines pathologiques à travers les différentes régions cérébrales (28,33,50–54) (Figure 3).

Dans la MA, les dépôts de Tau commencent dans le cortex entorhinal puis, progressent, apparemment par des réseaux connectés, à travers l'hippocampe, les cortex limbiques et associatifs (Figure 3b) (52,55). Cette évolution stéréotypée dans le temps et dans l'espace, initialement décrite par analyse neuropathologique post-mortem et plus récemment confirmée par étude en TEP-scan (56–59) , est corrélée avec le déclin cognitif (48).

Bien qu'affectant différentes régions cérébrales, des schémas de progression similaires à travers des circuits neuronaux connectés, ont été identifiés dans d'autres Tauopathies : la PSP (figure 3a) (28,33,50), l'AGD (figure 3c) (51), ou la PiD (figure 3d) (54). La progression similaire de ces pathologies avec une progression prioritaire vers les aires cérébrales connectées à celle primitivement atteinte, a conduit à l'hypothèse que ces maladies partagent, au moins en partie, des mécanismes communs de progression.

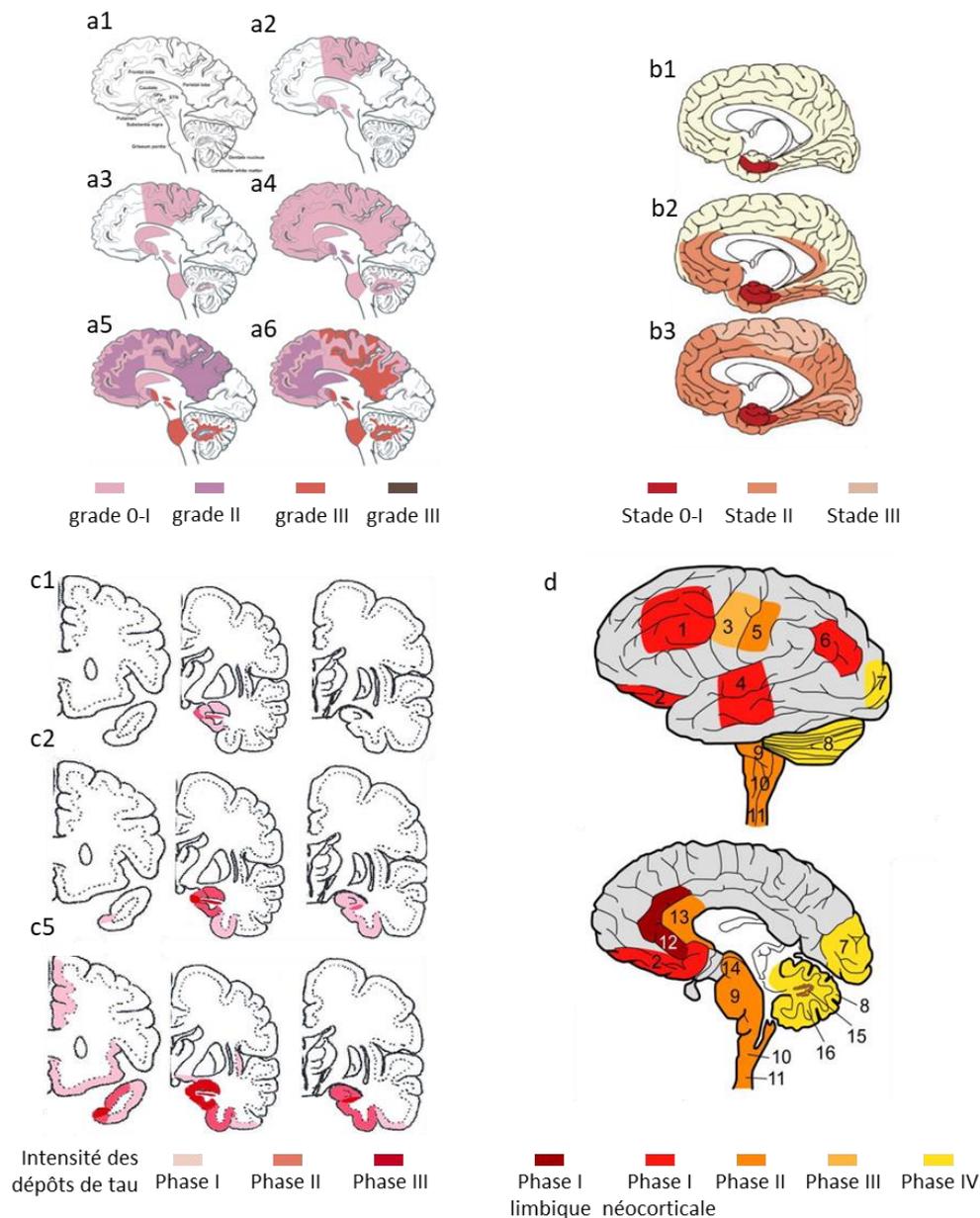


Figure 3 : Evolution temporo-spatiale des lésions Tau dans différentes Tauopathies

(a) Régions atteintes aux différents stades évolutifs de la PSP : Scores 0–1 (a2): atteinte du système pallido-luysonnigral et du cortex prémoteur ; Scores 2–3 (a3): atteinte modérée des noyaux gris centraux, des noyaux du pont et du noyau dentelé; Scores 4–5 (a4): atteinte plus sévère des noyaux gris centraux, des noyaux du pont et du noyau dentelé, du lobe frontal et du lobe pariétal; Scores 6–7 (a5) atteinte plus sévère des noyaux gris centraux, des noyaux du pont et du noyau dentelé, du lobe frontal et du lobe pariétal; Score >7 (a6): atteinte sévère de toutes les structure précédentes (adapté de Williams et al., 2007). (b) Régions atteintes aux différents stades évolutifs de la MA : Stade I (b1) région transentorhinale et entorhinale; stades I-II (b2): aires associatives; stades III-VI (b3) aires néocorticales (adapté de Braak et al. 2013). (c) Régions atteintes aux différents stades évolutifs de l'AGD : Stade I (c1): gyrus parahippocampique, CA1 antérieure de l'hippocampe, amygdale ; Stade II (c2): pole temporal, subiculum, cortex entorhinal et transentorhinal; Stade III (c3): gyrus angulaire, noyau accubens, insula, hypothalamus (adapté de saito et al. 2004). (d) Régions atteintes aux différents stades évolutifs de la PiD (d) : Phase I : régions limbiques et néocorticales temporales et frontales et du gyrus angulaire; Phase II substance blanche et des noyaux du tronc; Phase III : cortex moteur primaire ; Phase IV : atteinte du cortex visuel, du cortex cérébelleux et de la substance blanche du tronc (adapté de Irwin et al., 2016)

A. Propriétés des Prions

En parallèle, il a été montré depuis longtemps une propagation de protéines anormales par les réseaux neuronaux dans les maladies à prions. Les maladies à prions sont des pathologies neurodégénératives rares, caractérisées par l'accumulation de protéines prions mal repliées. En 1982, Prusiner et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que la protéine prion elle-même était un agent infectieux responsable de la pathologie, capable de se propager dans un individu et d'être transmis à un autre (60).

Le gène *PRNP*, codant pour la protéine prion (PrP) est constitué de deux ou trois exons selon l'espèce de mammifère mais la séquence codante se situe sur un exon unique, ce qui exclut toute possibilité d'épissage alternatif contrairement au gène *MAPT* (61,62). Le produit du gène *PRNP* est la protéine prion cellulaire (PrP^c) qui est une sialoglycoprotéine membranaire de 253 acides aminés chez l'Homme, ancrée à la membrane par une ancre GPI et possédant deux sites de glycosylation. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux, puis transite par l'appareil de Golgi avant d'être adressée à la membrane. La protéine prion cellulaire mature chez l'Homme, composée de 209 acides aminés (du résidu 23 au résidu 231), est divisée en plusieurs domaines : une partie N-terminale dont la séquence est très conservée et correspondant à un domaine de répétitions. – Un domaine central (92 à 135) : ce domaine contient une région hautement conservée entre les espèces. Il semble important dans la conversion de la PrP^c en protéine prion pathologique notamment de par sa propriété de passer d'une forme en hélice α vers des structures en feuillets β (63,64)- Un domaine C-terminal : il possède deux sites de N-glycosylation, permettant l'ancrage de chaînes latérales sucrées. Le dernier résidu, la sérine 231, est liée à un enchaînement glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), qui permet à la protéine de s'ancrer à la face externe de la membrane plasmique.

L'étude de la PrP par spectroscopie infrarouge, et dichroïsme circulaire et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont mis en évidence une structure secondaire riche en hélices α et pauvre en feuillets β aboutissant à une structure tertiaire globulaire de la région 121-231 qui semble stable. La région N-terminale est par contre flexible suggérant que ce domaine protéique puisse adopter plusieurs conformations en fonction de son environnement.

La forme pathologique de la PrP^c, la PrP^{sc} s'accumule dans le cerveau des sujets atteints d'encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST). La structure primaire de la PrP^{sc} est strictement identique à celle de la PrP^c et le profil de glycosylation de deux protéines est identique (65,66). Néanmoins, la structure secondaire, révèle des différences majeures entre les protéines. Ainsi l'analyse spectroscopique par transformée de Fourier et dichroïsme circulaire montre que la PrP^{sc} est majoritairement constituée de feuillets β (67,68). La principale différence entre la PrP^c et son analogue pathogène est donc de nature conformationnelle. La structure tertiaire de la PrP^{sc}, montrent une protéine composée de 2 hélices α et de 4 feuillets β (69,70). Cette conformation particulière confère à la PrP^{sc} des propriétés physico-chimiques très différentes de celles de la PrP^c et notamment une résistance partielle de la PrP^{sc} à la digestion par la protéinase K (PK). La structure tertiaire serait constituée par des monomères principalement composés de feuillets β empilés parallèlement, chaque résidu d'une protéine étant aligné avec le même résidu de l'autre molécule (71). Cette structure en feuillets β intermoléculaires parallèles sont capables d'initier *in vivo* l'activité de nucléation de la PrP (72).

Du point de vue mécanistique, le pouvoir infectieux de la PrP correspond à sa capacité à convertir les molécules de PrP^c en PrP^{sc}. Le contact de la PrP^{sc} avec de la PrP^c permet la conversion de la PrP^c en PrP^{sc} et la formation d'oligomères solubles puis de fibres insolubles. Le mécanisme de formation des fibres par recrutement de monomères par un oligomère initial, est appelé nucléation ou « seeding » (Figure 4) (73).

Aussi, une des particularités des ESST provient de la variabilité des phénotypes cliniques et neuropathologiques. Les facteurs participant à cette diversité ne sont pas encore complètement connus mais les caractéristiques génétiques de l'hôte ainsi que les propriétés de souches expliqueraient en partie cette diversité. La première expérience mettant en évidence ce phénomène de souches a été réalisée en 1973, à partir d'isolats de tremblante de la chèvre inoculés à la souris. Dans cette expérience, 5 souches ont pu être isolées sur la base des caractéristiques histopathologiques observées chez les souris inoculées. Les souches se différenciaient selon le degré de vacuolisation et la distribution des lésions de spongiose définissant ainsi le « profil lésionnel » (74). Les souches d'ESST se caractérisent par l'induction d'une maladie dont les caractéristiques sont très reproductibles lorsqu'on inocule un groupe d'animaux ayant le même fond génétique (75). Ainsi, pour une même dose infectante inoculée selon une voie donnée, chez des souris syngéniques, chaque souche, diffère selon : - 1/la période d'incubation 2/la localisation de la PrP anormale 3/ la distribution des lésions cérébrales.

Pour les agents infectieux conventionnels (bactéries, virus..), les souches sont habituellement liées à des variations génétiques. Pour le Prion, la séquence peptidique des différentes souches est souvent identique. L'information biologique associée à une souche serait codée par la structure tertiaire de la PrP^{sc}. Cette hypothèse est en accord avec le modèle de structure en feuillets β parallèles, dans lequel les différences de souches peuvent s'expliquer par les variations d'agencement des feuillets β .

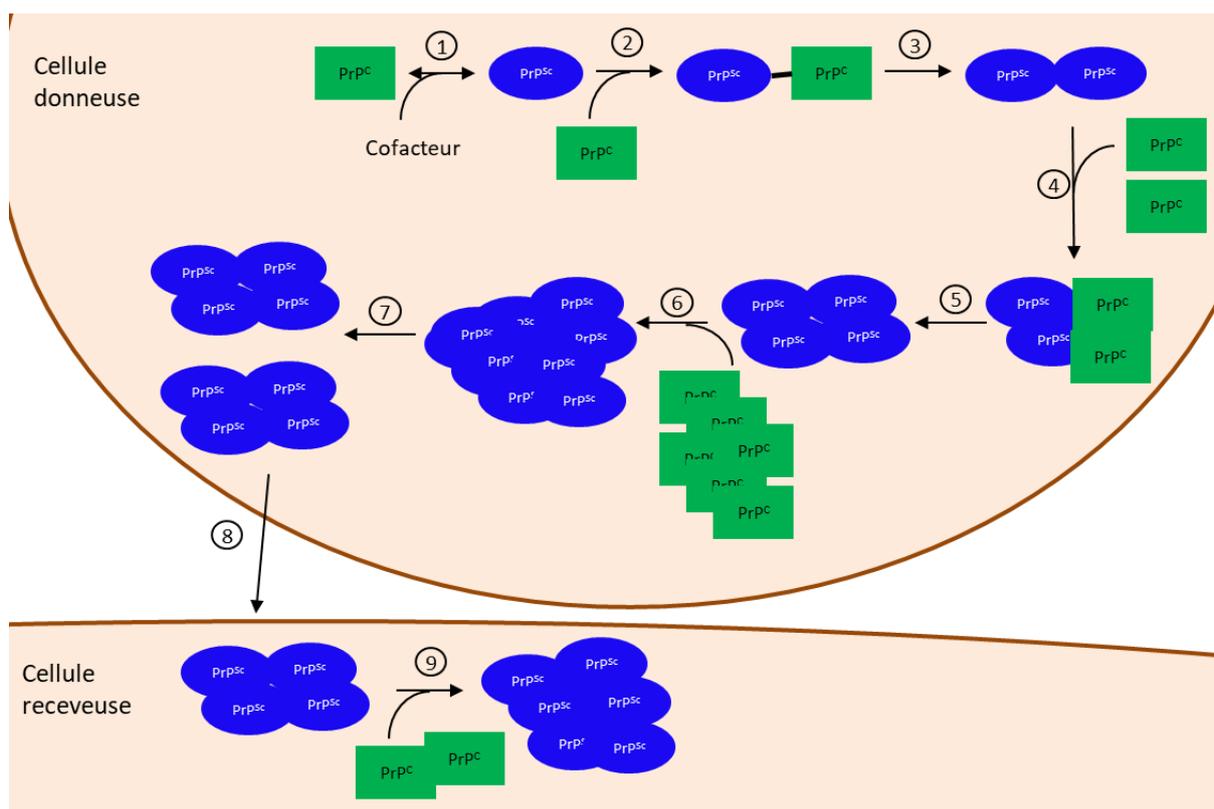


Figure 4 : Principe d'agrégation de la protéine prion

La protéine prion normalement repliée (PrP^C) peut devenir mal repliée (PrP^{Sc}) sous l'influence de cofacteurs (1) puis former un dimère avec de la PrP^C (2). La PrP^C est alors convertie en PrP^{Sc} (3). La PrP^{Sc} sous forme oligomérique recrute de la PrP^C (4) aboutissant à la formation d'un noyau (5) ayant un fort potentiel de recrutement (6). Ce noyau peut ensuite se diviser (7). Les nouveaux « noyaux » ainsi formés, appelés propagons, peuvent se propager d'une cellule à l'autre (8) et recruter puis convertir à nouveau de la PrP^C (9).

B. Hypothèse Prion-like de Tau

En parallèle à ces démonstrations sur le prion, le fait qu'il existe pour différentes tauopathies, des schémas d'atteinte, une cinétique de progression et des lésions neuropathologiques différentes mais relativement spécifiques pour une tauopathie donnée a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la protéine Tau pourrait partager des propriétés similaires avec la protéine prion avec notamment l'existence de souches (76). La localisation de l'initiation du processus pathologique puis le processus de propagation pourraient être déterminés par l'existence de souches de Tau. Le fait que des injections expérimentales de divers types d'extraits cérébraux de patients atteints de différentes tauopathies dans des modèles animaux induisent des lésions neuropathologiques différentes (77–79) et que le traitement de cellules cultivées par le même type d'extraits induit la formation de différents types d'inclusions (80) sont des arguments en faveur de l'existence de souches de Tau.

De plus, comme pour le prion, il a été mis en évidence des différences biochimiques (isoformes tau 3R + 4R, 3R et 4R) (16) et conformationnelles dans les Tauopathies (81). Néanmoins, comme pour le Prion, une souche de Tau doit être définie par une période d'incubation, la localisation tissulaire des dépôts et la distribution des lésions cérébrales. De plus ces propriétés doivent être conservées après un passage en série dans des modèles animaux.

Certaines de ces propriétés comme la localisation tissulaire et la morphologie des dépôts a été démontrée pour certaines tauopathies (77–79), mais les autres manquent (période d’incubation et distribution des lésions cérébrales).

D’autre part, par rapport aux Prions, ni la transmissibilité inter-humaine ni le rôle conformationnel de Tau dans le phénomène de conversion n’a à ce jour été démontré.

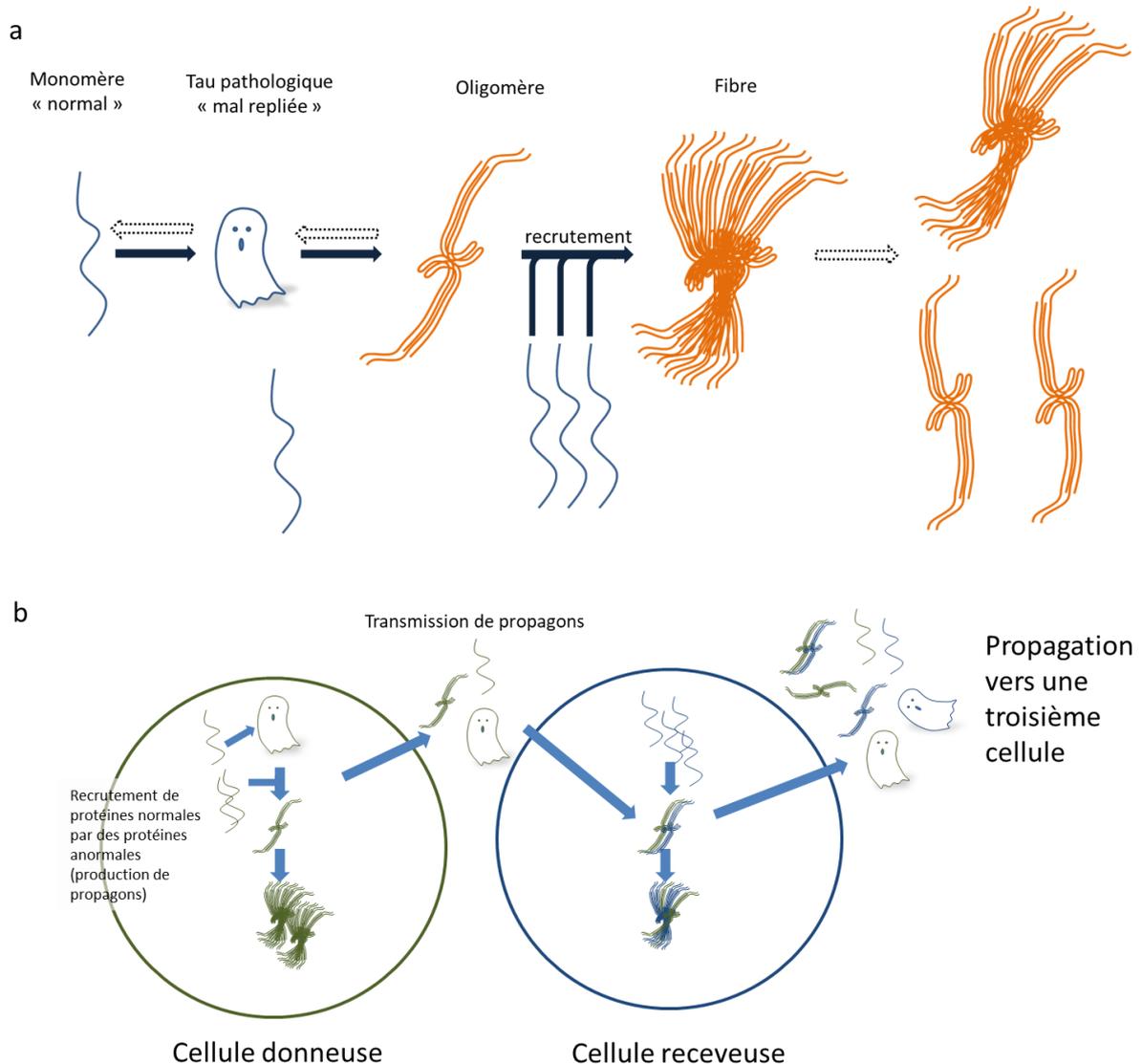


Figure 5 : Hypothèse prion-like appliquée à la protéine Tau

(a) recrutement de Tau : Les monomères de protéine Tau sont normalement solubles et peuvent devenir pathologiques. La protéine Tau pathologique peut alors recruter de la Tau normale aboutissant à des oligomères puis des multimères et des agrégats formés d’un corps central très condensé (domaines de liaison aux microtubules) et d’une périphérie moins condensée. **(b) Mécanismes de transfert de la protéine Tau « de type prion » d’une cellule à l’autre** : la protéine Tau anormale recrute la protéine Tau normale devenant à son tour anormale. Elle est ensuite sécrétée (propagons) par une cellule donneuse puis internalisée dans une cellule receveuse dans laquelle cette dernière va recruter de la protéine Tau normale.

III. Transmissibilité de la pathologie Tau, nucléation

De nombreuses études *in vitro* (82,83) et *in vivo* (49) portant sur la transmissibilité et les propriétés de nucléation de la protéine Tau ont permis de valider ces concepts (revues de la littérature (84–86)). Clavaguera et collègues ont montré que l'injection intracérébrale d'agrégats cérébraux de protéines Tau extraits de souris surexprimant une protéine Tau mutée, à des souris surexprimant une protéine Tau de type sauvage, était suffisant pour induire la pathologie Tau (49). De plus, l'injection de ce même extrait immunodéplété des protéines Tau, ou dont la fraction insoluble a été éliminée, n'induit pas la pathologie. Le même groupe a montré que l'injection de lysats de cerveaux humains atteints par différentes Tauopathies permettait d'induire une pathologie Tau avec des agrégats de protéines Tau dont la morphologie est proche de ceux retrouvés dans les cerveaux humains (77). Depuis ces publications, beaucoup d'études ont montré que l'injection de lysats cérébraux ou de fibres recombinantes de Tau chez les animaux transgéniques Tau, potentialisait l'apparition de la pathologie Tau (41,78,87–95). Dans plusieurs de ces études, il a été montré la présence de protéine Tau murine dans les agrégats, ce qui suggère que l'inoculat serait capable de recruter des protéines Tau endogènes (49,89,96,97). Le recrutement de la protéine Tau endogène murine a aussi été montré en injectant le même type d'inoculat que précédemment à des animaux non transgéniques (ne développant pas naturellement de pathologie Tau) (49,97), et à des souris transgéniques exprimant la protéine Tau humaine P301L (98). Plusieurs études récentes ont également montré l'effet potentialisateur de l' A β sur l'apparition de lésions Tau (47,99,100).

En parallèle de ces données sur des modèles animaux, plusieurs auteurs ont montré que des agrégats de protéines Tau, pouvaient être internalisés et favoriser l'agrégation de protéines Tau endogènes, soit dans des lignées cellulaires surexprimant Tau (48,101–107), soit dans des cultures primaires de neurones, soit dans des neurones issus de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) humaines surexprimant la protéine Tau humaine (108–110).

Il est donc maintenant admis que des espèces pathologiques de protéines Tau possèdent des propriétés de recrutement. Néanmoins, la nature de ces espèces (monomères, oligomères, multimères) fait encore débat. Par exemple, Mirbaha et ses collègues ont montré en 2015 qu'un trimère de protéine Tau est l'unité minimale avec un potentiel de recrutement, (111) avant d'identifier 3 ans plus tard, un monomère ayant des propriétés de recrutement (112). Cependant, la plupart des études s'accordent sur le fait que, la Tau oligomérique soluble serait responsable de la propagation, la diffusion d'agrégats volumineux paraissant impossible du point de vue cellulaire (41,91,110,113,114). Certains vont jusqu'à penser que les agrégats, par leur pouvoir « chélateur » pourraient ralentir l'évolution de la maladie, mais cela n'a jamais été démontré.

Ces différentes études ont permis de démontrer que la protéine Tau partage des propriétés communes avec la protéine prion : transmissibilité chez l'animal, agrégation et propagation à travers le système nerveux central. Néanmoins, les mécanismes de propagations ne sont que partiellement élucidés.

IV. Mécanismes de propagation de la protéine Tau

La première étape dans l'étude des voies de propagation de Tau a été de vérifier qu'il existe bien un transfert de Tau de cellules à cellules. Des modèles cellulaires utilisant des protéines Tau sauvages ou tronquées et agrégées ont permis de valider cette hypothèse (45,48,115,116).

L'utilisation de modèles cellulaires microfluidiques favorisant les échanges synaptiques suggère fortement l'existence d'un transfert de Tau transynaptique (45,110,117,118). En effet, il a été montré dans des modèles cellulaires que le transfert de milieu conditionné contenant de la protéine Tau est suffisant pour son transfert d'une cellule à l'autre (45,115,116).

In vivo, le transfert de la protéine Tau de cellules à cellules a été suggéré dans des modèles pour lesquels la pathologie Tau évolue du site d'injection de protéines Tau pathologiques aux zones étroitement connectées (49,87,89,95). Cependant, il est difficile d'éliminer un effet de diffusion de l'inoculum dans ces expériences. De manière plus convaincante, l'induction d'une surexpression de protéines Tau dans une zone cérébrale définie par l'utilisation de modèles transgéniques ou l'injection locale de vecteurs lentiviraux a permis de mettre en évidence un transfert de Tau, des neurones surexprimant Tau aux neurones connectés à distance (96,117,119–122), tout en s'affranchissant d'une potentielle diffusion de l'inoculum, au moins pour les modèles transgéniques.

Ces études ont donc démontré le transfert de protéines Tau de neurones à neurones ouvrant la voie à des études mécanistiques.

V. Les espèces pathologiques de Tau qui se propagent

Du point de vue clinique, les maladies neurodégénératives sont des maladies à évolution lente et il est difficile de déterminer un moment précis d'initiation de la maladie. Le fait que les phénomènes physiopathologiques débutent plusieurs années avant l'apparition des symptômes neurologiques est probablement à l'origine d'une limite floue entre la physiologie et la pathologie concernant l'étude de la protéine Tau.

Il est maintenant admis qu'un recrutement massif de protéines Tau aboutissant à des agrégats est pathologique. Cependant de nombreuses zones d'ombre subsistent quant aux relations entre les espèces pathologiques de Tau et la propagation. Nous ne savons pas si l'oligomérisation est toujours pathologique. En effet, la caractérisation d'une protéine Tau pathologique, des points de vue biochimique et structural reste encore à définir. De plus, le mécanisme par lequel la protéine Tau pathologique recrute la protéine Tau physiologique est inconnu. Il a été émis l'hypothèse d'un mécanisme similaire à celui de la protéine prion (« mauvais repliement ») mais la structure de la protéine Tau n'étant pas connue, cette hypothèse n'a jamais été démontrée. Ne connaissant pas les propriétés exactes des espèces pathologiques, leurs détections et leurs dosages sont difficiles. Pendant longtemps, la protéine Tau hyperphosphorylée, décrite dans les agrégats, a été considérée comme pathologique et précoce mais ce concept est débattu car la phosphorylation est réversible et considérée comme une modification tardive dans le processus pathologique par certains auteurs (123,124).

Depuis 2015, un modèle cellulaire utilisant un segment de protéine Tau mutée, comportant le domaine de liaison aux microtubules, couplé à des fluorophores, permet de détecter la présence d'espèces présumées pathologiques (40). Un autre modèle basé sur la chimiluminescence utilise une luciférase divisée, dont chaque partie est couplée à un fragment de Tau comportant le domaine de liaison aux microtubules et la mutation $\Delta K280$ (118). Dans les deux modèles, le rapprochement, soit des fluorophores soit des deux segments de luciférase, permet respectivement un transfert d'énergie (FRET) et l'émission de fluorescence ou de lumière.

Plus récemment, le développement de techniques de Tau RT-QuIC (real time quaking induced conversion) 3R et 4R a permis de détecter, à de très faibles concentrations, de la protéine Tau ayant des capacités de recrutement (125–127). Les modèles cellulaires basés sur le principe du transfert d'énergie sont contestés puisqu'ils évaluent les capacités de protéines à recruter un fragment de protéine Tau mutée, lui conférant des capacités d'agrégation bien supérieures à celles de la protéine Tau non mutée. Pourtant, ces modèles semblent à la fois spécifiques de la protéine Tau dotée de capacités de recrutement, mais également très sensibles puisqu'un signal positif précède les autres marqueurs de pathologie (agrégats intracellulaires, phosphorylation de la protéine Tau) dans plusieurs modèles murins de Tauopathie et sur des cerveaux autopsiques (124,128). Grâce à ce modèle, la présence de protéines Tau ayant des capacités de recrutement a également été montrée dans du LCR ventriculaire post-mortem (129), du LCR du tissu cérébral de souris transgéniques P301S (128) et PS19 (124) et des vésicules extracellulaires (VE) de l'ISF de souris transgéniques P301L (130). Les modèles de RT-QuIC quant à eux, semblent efficaces pour détecter la présence de protéine Tau pathologique dans les Tauopathies 3R ou 4R pures mais moins efficaces pour les Tauopathies mixtes 3R/4R. Ils sont également basés sur l'agrégation de fragments de protéine Tau mutée comportant une mutation anti-agrégative afin d'éviter l'agrégation des fragments les uns avec les autres. Dans tous les cas, ces modèles montrent une capacité de recrutement, mais jamais une capacité de conversion contrairement à la PMCA (protein misfolding cyclic amplification), méthode de référence pour la détection de protéine prion anormale.

La PMCA est une technique d'amplification de protéines infectieuses. Cette technique consiste à mélanger une faible quantité de protéine Prion pathologique (PrP^{Sc}) (amorce ou seed) avec un large excès de protéine prion cellulaire (PrP^C) contenu soit dans lysat cérébral soit dans des cellules. Ce mélange est ensuite soumis à des cycles d'incubation et de sonication. La phase d'incubation permet à la PrP^{Sc} la conversion et l'agrégation de la PrP^C en PrP^{Sc} . La phase de sonication fragmente les agrégats de PrP^{Sc} obtenus, ce qui permet d'obtenir de nouvelles unités de conversions pour la phase d'incubation suivante. La succession des différents cycles permet une amplification exponentielle de la PrP^{Sc} et donc de multiplier de très faibles quantités de PrP^{Sc} et de la rendre détectable même avec des techniques peu sensibles comme le Western-blot. L'étape d'amplification permet également d'obtenir de grandes quantités de PrP^{Sc} ayant un potentiel infectieux dont les propriétés liées à la souche sont conservées (131).

La QuIC est également une méthode d'amplification, utilisée pour la détection de PrP^{Sc} dans laquelle la phase de sonication est généralement remplacée par une phase d'agitation. Le substrat est une protéine prion recombinante (rPrP) dénaturée par l'urée ou l'hydrochloride de guanidine. La rPrP^C recombinante dénaturée est susceptible de se replier en oligomères β ou en fibrilles amyloïdes, riches en feuillets β . Ces deux conformations sont résistantes à la digestion par la protéinase K. L'agrégation de la rPrP peut être mesurée en temps réel par un système de fluorescence à la thioflavine T. Cette technique permet de détecter des quantités

très faibles de PrP^{Sc} et d'étudier le rôle de différents co-facteurs pouvant interagir dans le repliement pathologique de la rPrP. Néanmoins la rPrP agrégée ne semble pas avoir de propriété infectieuse in-vivo(132,133). La QuIC semble très reproductible et permet de discriminer, sur des prélèvements de LCR, avec une sensibilité de 80 à 91 %, et une spécificité de 98 à 100 %, les patients présentant une maladie à prions parmi des sujets témoins ou des patients atteints d'autres maladies. Cette technique a permis la mise en évidence de la PrP^{Sc} dans les brossages de la muqueuse olfactive de patients atteints de maladie de Creutzfeldt Jacob avec une sensibilité de 77 % et une spécificité de 100 %. La validité diagnostique de cette technique semble robuste pour les maladies à prion sporadiques mais semble modifiée dans certaines maladies à prion familiales notamment quand l'anomalie génétique influe sur le niveau de glycosylation de la PrP^{Sc} (131).

VI. Voies de transfert de cellules à cellules (figure 6)

Différentes voies de transfert de la protéine Tau de cellules à cellules ont été proposées :

1/ Le transfert *via* le milieu extracellulaire nécessitant la sécrétion et l'absorption de la protéine Tau. Ce transfert par la voie extracellulaire peut se faire par la synapse ou en dehors de la synapse. Dans les deux cas, le transfert de la protéine Tau de neurones à neurones pourrait s'opérer soit de façon directe, de neurones à neurones, soit par l'intermédiaire d'autres cellules (en particulier les cellules gliales). Par analogie, il a été montré avec la protéine prion, une diffusion indépendante des voies neuronales, par diffusion régionale de l'inoculat (134).

2/ Les transferts directs de cellule à cellule, sans passage par le milieu extracellulaire.

A. Mécanisme de sécrétion de Tau :

Pendant longtemps il a été postulé que la protéine Tau présente dans le milieu extracellulaire était le résultat d'une diffusion passive à travers la membrane plasmique. Pourtant, de multiples mécanismes semblent moduler la sécrétion de Tau, tout autant dans des conditions physiologiques et pathologiques.

Par exemple, l'activité neuronale augmente la libération de Tau par les neurones à la fois *in vitro* et *in vivo* (135,136). Cette augmentation a en particulier été observée aux stades précoces de la MA sporadique et familiale et dans les modèles murins de la MA, alors qu'il existe une hyperexcitabilité neuronale (136–140). Il a également été rapporté que la sécrétion de Tau, induite par l'hyperactivité neuronale, était associée à la fragmentation de l'appareil de Golgi. Cela indique que la membrane de l'appareil de Golgi pourrait jouer un rôle dans la sécrétion de Tau (141). De plus, l'induction de l'autophagie et / ou un dysfonctionnement lysosomal augmente la libération de Tau par les neurones corticaux primaires (142). Enfin, la protéine Tau trouvée dans le milieu extracellulaire lors de dommages cellulaires diffère de celle résultant de la sécrétion active (143,144) et il a été démontré que la séquence N-terminale 18-28 favorise la sécrétion de Tau par interaction avec les protéines EB (end binding protein)(145). Toutes ces observations plaident en faveur de mécanismes de sécrétion actifs de Tau par les neurones, possiblement modifiés en conditions pathologiques.

La sécrétion de la protéine Tau impliquant l'exocytose conventionnelle engageant l'appareil de Golgi, n'a jamais été démontrée. Cela n'est pas surprenant puisque cette protéine est majoritairement traduite dans le cytoplasme des neurones et en particulier dans le compartiment axonal pauvre en réticulum endoplasmique granuleux (146,147). De plus cette protéine ne comporte pas de séquence d'interaction avec les protéines membranaires des vésicules cargo du réticulum endoplasmique, contrairement à la majorité des protéines sécrétées par voie conventionnelle. La protéine Tau est par contre sécrétée sous forme vésiculaire et libre, par de multiples mécanismes dits non conventionnels.

Dans le milieu extracellulaire, la protéine tau est majoritairement présente sous forme libre et minoritairement « emballée » dans des vésicules extracellulaires (VE) (148–151), ce qui indique deux grands types de sécrétion.

1. Sécrétion de Tau libre (extravésiculaire)

a. Sécrétion directement à travers la membrane plasmique.

Deux études récentes ont démontré que la sécrétion de la protéine Tau peut se produire par translocation directe à travers la membrane plasmique (149,152). Ce type de sécrétion implique un recrutement et un enrichissement de la protéine Tau au niveau du feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique grâce à une hyperphosphorylation de Tau et de lipides spécifiques (phosphatidyl inositol 4, 5 phosphate, cholestérol et sphingolipides), puis une libération de la membrane plasmique, facilitée par la liaison de la protéine Tau aux héparanes sulfates protéoglycanes situés sur le feuillet extracellulaire de la membrane plasmique (figure 6).

b. Sécrétion à partir d'endo-lysosomes.

La protéine Tau peut également être présente dans des endo-lysosomes. La fusion des endo-lysosomes avec la membrane plasmique libère leur contenu dans l'espace extracellulaire sous forme libre.

La protéine Tau peut être délivrée aux endo-lysosomes par de multiples voies de transport de protéines.

Premièrement, en cas de stress cellulaire et de débordement du système de dégradation ubiquitine-protéasome, une voie de sécrétion des protéines anormales (repliement incorrect) peut être activée afin de diriger les protéines anormales vers les endo-lysosomes. Elles sont alors sécrétées dans l'espace extracellulaire.(150,153). Cette voie implique la capture initiale de protéines mal repliées par la protéine chaperonne ubiquitine carboxyl-terminal hydrolase 19 (USP19) à la surface du réticulum endoplasmique puis son transport jusqu'à l'endo-lysosome grâce à l'action des co-chaperons Hsc70 et DNAJC5 (DnaJ heat shock protein family member C5) (150,153).

Alternativement, des protéines cytoplasmiques anormales ou agrégées peuvent être délivrées aux endo-lysosomes par macro-autophagie (153). Plusieurs études ont ainsi suggéré le rôle de la macro-autophagie dans la sécrétion de la protéine Tau (154–156). Tang et ses collègues ont montré qu'une activation de la voie mTOR entraîne une augmentation de la concentration de la protéine Tau et de sa phosphorylation, aboutissant à sa délocalisation dans les vésicules d'autophagie et dans le réticulum endoplasmique. Ce mécanisme, suggère donc l'existence d'un mécanisme d'exocytose non exosomal (155). Cependant, nous ne savons pas si les autophagosomes délivrent du Tau aux endo-lysosomes ou s'ils sont capables de fusionner

directement avec la membrane plasmique et de libérer leur contenu directement dans le milieu extracellulaire.

Il a également été démontré que les endosomes tardifs pouvaient sécréter de la protéine Tau libre via Rab7A, une GTPase associée aux endosomes et impliquée dans leur trafic (154). En effet, dans les neurones corticaux primaires, la protéine Tau est partiellement co-localisée avec des structures positives pour Rab7A et sa sécrétion est considérablement réduite en cas de diminution de Rab7A (154). Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la MA, puisqu'il a été montré que dans les stades précoces de MA, Rab7A augmente et qu'il y a une accumulation de structures endosomales.

2. Sécrétion de Tau dans des vésicules extracellulaires (VE)

Différents mécanismes de sécrétion impliquant les VE ont été démontrés pour la protéine Tau.

Le premier mécanisme implique des structures intracellulaires, telles que des corps multivésiculaires ou des endo-lysosomes, et peut entraîner la sécrétion de Tau contenu dans des petites VE (~ 50 à 150 nm de diamètre) appelées exosomes (157). Les exosomes ont été très étudiés dans le domaine de l'oncologie car ils auraient un rôle important dans la communication intercellulaire et en particulier dans le modelage de l'environnement tumoral (158). Leur genèse est bien caractérisée : lors de l'endocytose, l'invagination de la membrane plasmique conduit à la formation d'un endosome primaire. D'autres invaginations se produisent dans la membrane de cet endosome, conduisant à la formation d'un corps multivésiculaire. Au cours de cette étape, les vésicules intraluminales piègent le matériel cytoplasmique. Lorsque le corps multivésiculaire fusionne avec la membrane plasmique, les vésicules intraluminales sont libérées et appelées exosomes. Il a été montré que ceux-ci étaient, entre autres, impliqués pour le transport du prion (159), du peptide A β (160) et de la synucléine (161,162).

Un deuxième mécanisme implique des VE de plus grande taille (~ 100 à 1000 nm de diamètre), appelées ectosomes. Ces VE sont directement formées par bourgeonnement de la membrane plasmique vers l'extérieur, et leur contenu est une portion de cytoplasme de la cellule d'origine.

La présence de protéine Tau a été démontrée dans des ectosomes à la fois issus du surnageant de cultures primaires de rats, de lignées cellulaires et dans l'ISF de cerveaux de rats (148). Spitzer et collaborateurs ont également montré la présence d'ectosomes dans le LCR humain. Leur nombre est similaire chez les sujets sains et les patients atteints de MA mais la quantité de Tau et d'A β contenue dans les ectosomes est plus faible chez les patients atteints de MA (163). La présence de cette protéine a également été détectée dans les exosomes purifiés à partir du surnageant de plusieurs lignées cellulaires (118,148,164,165), de cultures primaires de neurones murins (118,148), de l'ISF de cerveau de souris transgéniques Tau (P301L), de cultures primaires de microglie préalablement traitées par des fibres de Tau recombinante (166), dans du LCR humain (164) et dans le plasma de patients atteints de MA, de patients MCI et de personnes saines (167). La protéine Tau phosphorylée contenue dans les exosomes plasmatiques d'origine neuronale est augmentée par rapport aux sujets contrôles, montrant que ce dosage pourrait avoir un intérêt diagnostique. Aussi, l'injection intracérébrale de ces VE issues de patients atteints de MA induit des inclusions neuronales dans l'hippocampe de

souris de phénotype sauvage (167). Polanco et collaborateurs ont également montré la présence de Tau ayant un potentiel de nucléation dans les VE issues de liquide interstitiel cérébral d'un modèle de souris transgénique (130).

On ne connaît pas à ce jour le rôle de la sécrétion de la protéine Tau dans les VE. Il semble qu'elle soit physiologiquement sécrétée dans les ectosomes et les exosomes mais que l'augmentation de la concentration intracellulaire de la protéine Tau induit une sécrétion par les exosomes (148,163).

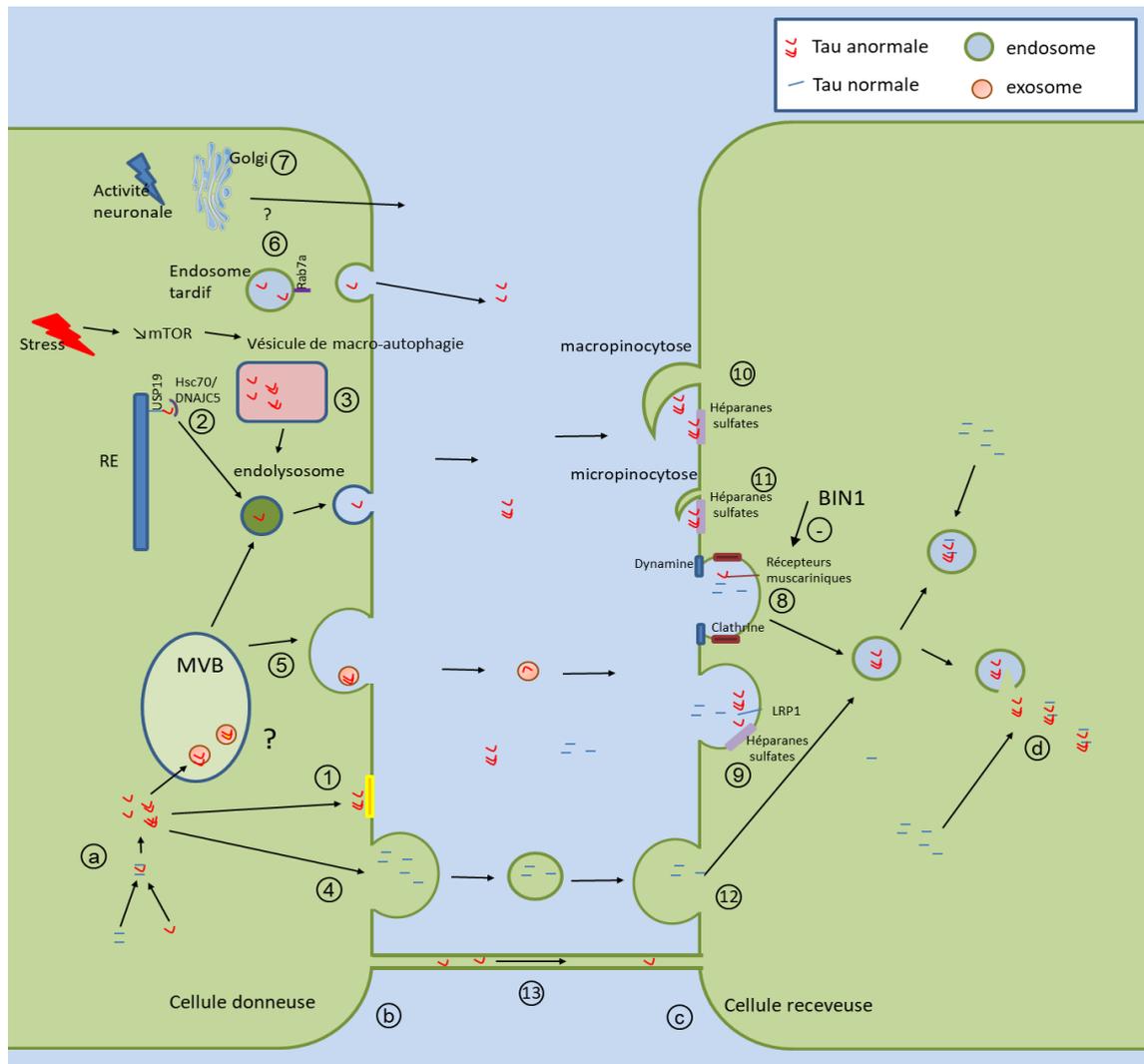


Figure 6 : Mécanismes de transfert de la protéine Tau «de type prion» d'une cellule à l'autre.

Le mécanisme prion : La protéine Tau anormale recrute la Tau normale (a) devenant à son tour anormale. Elle est ensuite sécrétée (propagons) par une cellule donneuse (b) puis internalisée dans une cellule receveuse dans laquelle cette dernière va recruter de la protéine Tau normale (d). La protéine Tau pathologique peut être transférée entre les cellules par de multiples mécanismes. Elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme libre soit directement à travers la membrane plasmique (PM) grâce à des régions riches en lipides spécifiques (1) ou à partir d'endolysosomes (2). La protéine Tau peut entrer dans les endolysosomes grâce à son recrutement sur le réticulum endoplasmique (RE) par USP-19 (2) puis son transfert grâce aux cochaperones Hsc70et DNA JC5 ou, en cas de stress, par inactivation de la voie mTor, induisant la formation de vésicules de macroautophagies devenant des endolysosomes après fusion avec le lysosome (3). La protéine Tau peut être sécrétée par voie vésiculaire : elle est sécrétée dans les ectosomes (4) ou « emballée » dans des exosomes par invagination de la membrane des endosomes tardifs conduisant à la formation de vésicules intraluminales dans les corps multivésiculaires (MVB). Ces vésicules peuvent être sécrétées par fusion des MVB avec la MP (5). La sécrétion de la protéine Tau est également favorisée par la protéine Rab7a via les endosomes tardifs (6) ou par l'activité neuronale en entraînant une fragmentation de l'appareil de Golgi (7). Mécanismes d'internalisation dans la cellule receveuse : La protéine Tau libre extracellulaire peut être endocytée grâce à des mécanismes dépendants de la dynamine/clathrine grâce à des récepteurs aux récepteurs muscariniques (8) ou grâce à des mécanismes indépendants de la clathrine en se fixant sur LRP1, les héparanes sulfates agissant comme cofacteurs (9). L'endocytose de Tau est réprimée par diminués par BIN1. Tau peut également être internalisée par macropinocytose (10) et micropinocytose (11). La voie d'entrée de Tau par les exosomes n'est pas connue. Les ectosomes peuvent fusionner avec la PM (12). Enfin, la protéine Tau peut être transférée directement par les nanotubes tunnélisés (13).

3. Les espèces de protéines Tau sécrétées

La nature des espèces de protéines Tau sécrétées semblent être dépendante du modèle utilisé et du type de sécrétion. Les espèces sécrétées libres directement à travers la membrane plasmique sont solubles, oligomériques ou monomériques et phosphorylées. Le type de protéines Tau sécrétées dans les VE est plus variable : entière, fragments clivés en C-terminal ou N-terminal, soluble ou insoluble, phosphorylée ou déphosphorylée. Chez l'humain, les espèces de Tau sécrétées dans les VE (plasma et LCR) sont au moins en partie phosphorylées, qu'elles proviennent de sujets sains ou atteints de Tauopathie (118,164,167–170).

B. Mécanismes d'internalisation de Tau

Plusieurs études ont montré que la protéine Tau placée dans le milieu extracellulaire est internalisée dans le soma de neurones primaires, suggérant l'existence d'un ou plusieurs mécanisme(s) d'absorption (45,48,108,110,115,116,137,171). Il a également été observé l'absorption de monomères et d'oligomères de Tau *in vivo* (46,110) par des neurones humains dérivés de CSPi (172).

Les oligomères de protéines Tau peuvent être internalisés par endocytose dépendante de la clathrine/dynamine et transportés dans les cellules receveuses dans la voie endolysosomale (171). La micropinocytose semble également jouer un rôle dans l'absorption pathologique de protéines Tau à la fois *in vitro* et *in vivo*. Avant d'être internalisées par micropinocytose, les protéines Tau se lient aux héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) de la membrane plasmique, qui favorisent les réarrangements de la membrane avant l'endocytose (102,173,174). Les HSPG sont également impliqués dans l'internalisation d'agrégats de protéines Tau par macropinocytose. La forme trimérique semble être la taille minimale pour initier ce mécanisme (111,173). La 6-O-sulfatation des chaînes latérales d'héparane sulfate semblent cruciale pour leur liaison à la protéine Tau et son internalisation (102). Tau peut également être internalisée en se fixant sur LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1), les HSPG ayant alors un rôle de corécepteur (175).

Evans et collaborateurs ont montré que la macropinocytose est la voie d'entrée préférée des monomères de protéine Tau et des petits oligomères (bien qu'ils puissent également être internalisés par endocytose (176)), tandis que l'endocytose dépendante de la clathrine/dynamine est favorisée pour les agrégats plus gros (176). L'endocytose dépendante de la clathrine/dynamine peut également être déclenchée par la fixation directe de protéines Tau sur les récepteurs muscariniques (177).

De manière générale, l'internalisation des exosomes peut se faire de diverses manières : macropinocytose, endocytose médiée par les HSPG, micropinocytose fusion directe avec la membrane plasmique. Néanmoins, ces mécanismes, très étudiés dans le domaine de l'oncologie n'ont jamais été prouvés pour l'internalisation des exosomes contenant Tau (157).

Une fois que la protéine Tau est internalisée dans la cellule par endocytose, une rupture de la membrane endosomale permettrait à la protéine de se retrouver libre dans le cytoplasme (178). Ce mécanisme permettrait le recrutement de la protéine Tau normale dans la cellule hôte. Cependant, Michel et ses collègues suggèrent qu'une agrégation de Tau à partir de monomères pourrait se produire directement à l'intérieur des vésicules d'endocytose et favoriseraient ainsi la propagation de la pathologie Tau (179).

Ces mécanismes d'endocytose pourraient participer activement à la propagation pathologique de Tau. En effet, Calafate et ses collègues ont montré que BIN1, facteur de risque génétique de la MA (180), régule négativement l'endocytose et qu'une perte de fonction de BIN1 augmente l'absorption et la formation intracellulaire d'agrégats de Tau (178). PICALM, également identifiée comme un facteur de risque génétique de MA (180) et impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine/dynamine est présente dans les dépôts de protéines Tau intraneuronales de plusieurs Tauopathies, ce qui permet de supposer son implication dans l'internalisation neuronale de Tau (181).

C. Nanotubes

Les nanotubes tunnélisés (TNT) constituent également une voie originale de transfert cellule/cellule susceptible de participer à la propagation de la pathologie Tau (182,183). Les nanotubes sont des structures membranaires filiformes et creuses d'un diamètre de 50 à 800 nm formant des ponts capables de relier des cellules distantes. Il a été démontré qu'ils peuvent transférer des protéines prion ainsi que des virus et des organites ou tout autre matériel cytoplasmique (184–186). Tardivel et ses collègues ont montré que Tau pouvait se propager à travers ces TNT et que la Tau extracellulaire peut induire leur formation (182,183).

En résumé, il a été mis en évidence plusieurs voies de transmission des protéines Tau d'une cellule à une autre dont les rôles physiologiques et/ou pathologiques restent, pour la plupart, à déterminer. Or la compréhension des mécanismes de sécrétion et d'internalisation est primordiale pour le développement de thérapeutiques afin de cibler les voies participant à la propagation d'espèces pathologiques et non celles impliquées dans leur dégradation.

VII. Types cellulaires impliqués dans la propagation de Tau

Comme décrit précédemment, la majorité des études in-vitro sur la propagation de Tau ont été faites sur lignées cellulaires ou sur des cultures primaires de neurones. En effet, la protéine Tau est majoritairement exprimée dans les neurones et ces cellules sont considérées comme les principales cellules fonctionnelles du SNC. Il paraissait donc important de se focaliser sur ce type cellulaire. Or, nous savons maintenant que les cellules gliales, plus nombreuses que les neurones, ont un rôle fondamental dans le système nerveux central.

De plus, depuis longtemps, des agrégats de Tau ont été repérés dans les cellules gliales au cours des Tauopathies. L'origine de ces agrégats apparaissait mystérieuse compte tenu de l'absence d'expression du gène *MAPT* dans les cellules gliales. La découverte récente de la propagation de la protéine Tau de cellule à cellule suggère que ces mécanismes soient impliqués dans l'apparition des lésions gliales se développant au cours des Tauopathies.

Il existe 4 familles principales de cellules gliales : les cellules microgliales, considérées comme les macrophages du SNC, les oligodendrocytes dont le rôle principal est la myélinisation axonale, les cellules épendymaires bordant les ventricules et les astrocytes.

Ces derniers ont été nommés ainsi en raison de leur forme étoilée. Ils comportent en effet de multiples prolongements ramifiés capables d'interagir avec de multiples cellules. Par leur interaction avec les neurones ils participent entre autres à la constitution de la synapse tripartite. Ils participent également à la constitution de la barrière hémato-encéphalique et du système glymphatique (187). Leurs positions histologique et fonctionnelle « tentaculaires » laissent à penser qu'ils pourraient avoir un rôle charnière dans la propagation de Tau. Pour ces différentes raisons nous allons nous focaliser sur ces cellules.

A. Les astrocytes

Les astrocytes ont un rôle primordial dans le système nerveux central. Dans le cerveau mature, les astrocytes régulent la transmission synaptique non seulement par leur rôle physique dans la constitution de la synapse tripartite mais également par la sécrétion de gliotransmetteurs et par la recapture de neurotransmetteurs auxquels ils sont capables de répondre. Par ailleurs, les astrocytes ont un rôle clé dans la constitution de la barrière hémato-encéphalique (BHE), dont ils sont capables de réguler la perméabilité (188). En contact avec les cellules endothéliales et les péricytes par les podocytes et avec les neurones (axones, synapses, péricarion), ils jouent un rôle important dans le transport de nombreuses substances métaboliques et régulatrices (189,190) et le maintien de l'homéostasie cérébrale en régulant l'ionostasie, le taux de métabolites et l'apport énergétique (187). Ils ont également un rôle important dans l'élimination de substances et de cellules.

1. Mécanismes de clairance

La clairance des cellules lésées est essentielle pour le maintien de l'homéostasie tissulaire. À cette fin, les cellules apoptotiques affichent des signaux permettant de déclencher la phagocytose par les astrocytes (191). Chez l'humain, il a été montré l'élimination des neurones apoptotiques par les astrocytes dans le cerveau en développement (192), et chez la drosophile, que les astrocytes ont la capacité de phagocyter des débris de neurones (193). On peut donc imaginer qu'il existe des phénomènes similaires lors de la mort neuronale induite par des agrégats de protéines Tau.

Aussi, des études récentes ont identifié, chez l'animal, le système glymphatique comme une voie critique pour l'élimination de protéines neurotoxiques, qui s'accumulent dans les maladies neurodégénératives. Cet espace glymphatique est constitué par les pieds astrocytaires, entourant les artères, les capillaires et les veines (194). Le transport glymphatique serait responsable de la clairance d'environ 65% du peptide β -amyloïde chez le rongeur (195), et les altérations du système glymphatique, après des lésions cérébrales traumatiques (TBI), ont conduit à une augmentation de la pathologie Tau (196).

Le système glymphatique a également été décrit chez l'humain (197), suggérant que les astrocytes pourraient être impliqués dans la clairance des protéines normales et/ou anormales.

2. Homéostasie cérébrale

Une des fonctions des astrocytes est le maintien de l'homéostasie cérébrale en régulant l'ionostasie, le taux de métabolites et l'apport énergétique par une activité mitochondriale intense (187). Les astrocytes sont des cellules très plastiques qui forment un réseau parallèle à la connectivité neuronale leur permettant de contrôler étroitement l'homéostasie moléculaire et métabolique et d'ajuster les variations de l'activité du réseau neuronal. À cette fin, les astrocytes peuvent libérer plusieurs molécules appelées gliotransmetteurs.

B. Tau et glie

Par la description succincte du rôle des astrocytes nous comprenons que les astrocytes sont étroitement liés aux neurones du point de vue physique et fonctionnel, qu'ils opèrent continuellement des échanges avec les neurones, et qu'un dysfonctionnement de ceux-ci peut entraîner des dysfonctions cérébrales multiples : synaptiques, énergétiques, équilibre ionique, BHE...

Hors, depuis longtemps, des agrégats gliaux de protéines Tau ont été décrits dans les cellules gliales de différentes Tauopathies (198–200) et plus récemment dans l'astrogliopathie Tau liée au vieillissement (1). Ces agrégats peuvent prendre diverses morphologies : on trouve principalement les touffes astrocytaires dans la PSP, les plaques astrocytaires dans la DCB et les corps bobinés correspondant à des inclusions oligodendrogiales.

Par analogie avec la pathologie neuronale Tau, le schéma de distribution des inclusions astrocytaires Tau dans l'ARTAG, la PSP et la CBD suggère une évolution hiérarchique des régions cérébrales. Pour répondre à cette question, une analyse de probabilité conditionnelle a été menée pour déterminer la chronologie de la pathologie astrogliale dans le CBD et la PSP (28).

Les propriétés biochimiques (isoformes 3R ou 4R) des inclusions gliales semblent identiques aux inclusions neuronales pour une maladie donnée (26). Néanmoins, Richetin et collaborateurs ont décrit une accumulation de protéines Tau non hyperphosphorylées dans les astrocytes de l'hippocampe de patients humains atteints de MA avancée (201).

La différence morphologique entre les astrocytes en touffes et les plaques astrocytaires, dont la présence de l'un ou de l'autre semble être un bon critère pour le diagnostic de PSP et de DCB, est liée à la localisation intracellulaire des inclusions : périnucléaire et dans la partie proximale des prolongements dans les astrocytes en touffes, et dans la partie distale des prolongements dans les plaques astrocytaires (26). Comme dans les neurones, la différence morphologique de ces agrégats est possiblement liée à la souche de Tau mais pourrait également être liée au type d'astrocyte atteint.

Plusieurs modèles murins ont permis d'étudier le rôle de la glie dans les Tauopathies. En effet, on retrouve dans plusieurs modèles de souris transgéniques exprimant la protéine Tau humaine mutée (P301L et G272V sous contrôle du promoteur prion), des agrégats de protéines Tau dans les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones (202,203). Un modèle de souris transgénique pour une protéine Tau 3R sauvage humaine sous le contrôle du promoteur du gène Tα1 α-tubuline de souris permet l'expression de Tau 3R humaine dans les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones. Après 3 à 20 mois, apparaissent, des agrégats de protéines Tau dans les oligodendrocytes et les astrocytes, dont la morphologie est similaire

à des corps bobinés ou des plaques astrocytaires. La présence de ces agrégats est relevée surtout au niveau de la moelle épinière, du tronc cérébral et du cervelet. Il existe dans ces régions une diminution du nombre de neurones, astrocytes et oligodendrocytes et une démyélinisation associée à une dégénérescence axonale sans agrégat de protéines Tau dans les neurones. La perte de fonction et la mort des cellules gliales entraîneraient donc une dysfonction et une mort neuronale (204). Dans un autre modèle (souris transgéniques exprimant la protéine Tau sous contrôle du promoteur de la GFAP) (205) il est observé une accumulation de protéines Tau âge dépendante dans les astrocytes. Ces protéines sont anormalement phosphorylées, ubiquitinilées et fibrillaires. Dans les régions (principalement médullaires) où ces agrégats de protéines Tau sont abondants, il existe une rupture de la BHE et une mort neuronale sans que la protéine Tau ne soit détectée dans les neurones. Aussi, il a été montré sur des modèles de surexpression de protéines Tau *in vivo* et *in vitro* que l'accumulation d'isoformes Tau dans les astrocytes affecte l'intégrité des réseaux mitochondriaux (Richetin et al., 2020). Ces agrégats intra astrocytaires induiraient donc une toxicité neuronale indirecte. *In vitro*, le traitement de co-culture neurones/astrocytes par des fibrilles de protéines Tau recombinantes réduit la sécrétion de gliotransmetteurs et induit une dysfonction synaptique (206).

1. Implication de la glie dans la propagation de l' α -synucléine et les maladies à prion

Quelques études existent sur le rôle de la glie dans les synucléinopathies. Il a été montré *in vitro* (cocultures d'astrocytes primaires avec une lignée de cellules neuronales surexprimant la protéine l' α -synucléine) un passage de l' α -synucléine sous forme monomérique ou agrégée d'un type cellulaire à l'autre (207). Ce transfert d' α -synucléine induit dans les astrocytes une augmentation d'expression des gènes de cytokines et chémokines promouvant la neuroinflammation. Ceci est confirmé chez des souris transgéniques exprimant l' α -synucléine sous contrôle du promoteur neuronal platelet-derived growth factor β' (PDGF β') chez lesquelles il est observé des inclusions intra-astrocytaires d' α -synucléine (207). Des modèles murins d'atrophie multi-systématisée (synucléinopathie dans laquelle on retrouve de nombreux agrégats de synucléine dans les oligodendrocytes) dans lesquels l' α -synucléine est surexprimée sous contrôle de promoteurs oligodendrogliaux (« 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase »; « myelin basic protein »), aboutissent à une perte motrice (208,209). Histologiquement, il existe une accumulation d' α -synucléine au niveau des oligodendrocytes, mais également dans les neurones au niveau axonal, laissant donc penser qu'il existe un transfert d' α -synucléine d'oligodendrocytes à neurones (209). Reyes et collaborateurs ont observé l'internalisation de monomères, oligomères et de fibrilles d' α -synucléine dans les oligodendrocytes, à la fois *in vitro* et *in vivo* par injection stéréotaxique dans le striatum de souris. Ils ont également pu observer un transfert d' α -synucléine sauvage humaine de neurones à oligodendrocytes en induisant une surexpression d' α -synucléine dans les neurones de la substance noire par injection stéréotaxique de vecteurs adénoviraux suivie d'une greffe de progéniteurs neuronaux et oligodendrogliaux (210)

Il a également été montré une internalisation de la protéine prion (« scrapie protein prion »), plus efficace dans les astrocytes que dans les neurones. Cette protéine est ensuite transportée jusqu'au compartiment endosomal/lysosomal sans que celle-ci ne puisse être dégradée (211).

2. Implication des astrocytes dans la propagation de Tau

Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que le transfert de protéines Tau pathologiques entre les cellules et entre les régions cérébrales anatomiquement connectées, pouvait se faire via les neurones et les oligodendrocytes (212). Il a également été observé l'absorption d'oligomères de Tau recombinante par les astrocytes en culture (166,206,213). Martini-Stoica et ses collègues montrent également qu'une augmentation d'expression de facteurs de transcription EB (TFEB), un activateur de la voie lysosomale, favorise l'absorption de protéines Tau recombinantes dans les astrocytes *in vitro*. Chez la souris, la surexpression de TFEB diminue la pathologie Tau et réduit sa propagation (213). Cette publication suggère que les astrocytes pourraient avoir un rôle dans la clairance de la protéine Tau. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Goetzl et collaborateurs ayant montré la présence de protéine Tau (phosphorylée et non phosphorylée) dans les VE plasmatiques dérivées d'astrocytes (214).

OBJECTIFS DE L'ETUDE :

Il est maintenant admis que la protéine Tau partage des propriétés communes avec la protéine prion : transmissibilité chez l'animal, recrutement, agrégation et propagation à travers le système nerveux central. La propagation de protéines pathologiques est vraisemblablement responsable de l'évolution de la pathologie mais les voies de propagation de protéines pathologiques sont mal connues. De plus, il est souvent difficile, dans les différents modèles, de discerner les mécanismes physiologiques des mécanismes pathologiques. Aussi, depuis plusieurs années, notre équipe a démontré la présence de protéine Tau dans les VE issues de multiples fluides non humains (surnageants de cultures primaires de neurones murins, LCR de primates non-humains, ISF murins) sans pouvoir déterminer s'il s'agit d'artéfacts liés aux modèles, de mécanismes physiologiques ou de mécanismes présents dans les Tauopathies. Déterminer sur du matériel de patients atteints de Tauopathie si les VE contiennent de la Tau pathologique nous paraît donc une étape indispensable. En effet, cela pourrait permettre à terme de développer des thérapeutiques efficaces, à la fois en ciblant les principales voies de propagation de Tau et en déterminant des marqueurs précoces de la maladie afin de traiter dès le stade précoce.

Les deux premiers objectifs de ce travail sont donc de :

1/ de vérifier l'hypothèse selon laquelle la protéine Tau pathologique est présente dans les VE extraites de tissus de patients atteints de différentes Tauopathies et que ces dernières peuvent induire de la pathologie chez l'animal.

2/ de détecter des espèces pathologiques de Tau dans les VE contenues dans le plasma et le LCR, potentiels biomarqueurs de Tauopathies.

D'autre part, des agrégats de protéines Tau sont décrits depuis longtemps dans les astrocytes ; leur abondance et leur morphologie dépendent de la Tauopathie. Certaines études suggèrent que les astrocytes pourraient avoir un rôle dans la propagation de la pathologie Tau (diminution ou augmentation) et que leur dysfonction serait responsable de modifications synaptiques ou mitochondriales. Il n'existe à ce jour aucune démonstration d'un transfert de protéine Tau de neurone à astrocytes.

3/ le troisième objectif de ce travail est de déterminer si de la protéine Tau peut être transférée d'un neurone à un astrocyte et dans le cas échéant, de déterminer la/les voies de transfert.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

A. Anticorps utilisés

Les anticorps suivants ont été utilisés pour l'immunohistochimie (IHC), les dosages biochimiques et la microscopie électronique aux dilutions indiquées:

- Anticorps monoclonal (mab) AT8, qui reconnaît les phosphosérines 202, 205 et 208 de Tau (Malia et al 2016) (MN1020; Thermo Scientific, Illkirch, France; 1/500 pour IHC);
- mAb MC1 fourni par le Dr Peter Davis (1/1000 pour IHC). Il reconnaît les changements conformationnels de Tau ; sa réactivité dépend à la fois de l'extrémité N terminale (acides aminés 7–9) et de la séquence d'acides aminés 313 à 322 située dans le troisième domaine de liaison des microtubules (215,216);
- mAb Anti-HSP 90 α / β (F-8) (sc-13119; 1/100 pour le Western-blot);
- mAb anti- α -tubuline (ProteinTech 66031-1, 1/10000 pour le Western-blot) ;
- anticorps polyclonal anti-histone H3 (Millipore 07-960, 1/10000 pour le Western-blot).
- mAb anti-CD63 (Novasbio, H5C6, nbp2-42225, 1/50 pour la microscopie électronique).

B. Animaux

L'expérimentation animale a été réalisée avec l'approbation d'un comité d'éthique (accord APAFIS # 2264-2015101320441671 de CEEA75, Lille, France) et suit les directives européennes d'utilisation des animaux.

Les animaux (mâles et femelles) ont été hébergés dans une pièce à température contrôlée entre 20 et 22 ° C avec un cycle jour / nuit de 12 heures, un accès illimité à l'eau et à la nourriture dans une animalerie exempte d'agents pathogènes. Les animaux ont été répartis dans des groupes expérimentaux par randomisation.

Les souris THY-Tau30 (Tg30Tau) expriment la protéine Tau 1N4R humaine avec deux mutations pathogènes (P301S et G272V) sous le contrôle du promoteur Thy-1.2 spécifique aux neurones (217,218).

La souris APP/PS1 est un modèle de MA APP/PS1 familial, permettant la surexpression d'A β 42 humaine s'accumulant dans les plaques à partir de 6 mois (203).

C. Echantillons humains

1. Tissu cérébral humain utilisé pour l'extraction de l'ISF et la quantification des lésions

Les tissus cérébraux de patients témoins (décédés d'une pathologie autre que cérébrale), atteints de MA, de PSP ou de maladie de Pick, et les LCR ventriculaires (LCR-V) ont été obtenus auprès de la Neurobanque de Lille (conformément aux critères de la loi française sur les ressources biologiques, et déclarés à l'autorité compétente sous le numéro DC-2008-642). Les échantillons ont été stockés au centre de ressources biologiques (CIC1403, BB-0033-00030) à -80°C.

2. LCR et plasmas (or cohorte ecTAUsome)

Les plasmas et LCR prélevés par ponction lombaire (LCR-PL) de patients témoins ou atteints de MA, ont été obtenus auprès du centre de ressources biologiques (CIC1403, BB-0033-00030) et conservés à -80°C. Les données démographiques sont répertoriées en annexes.

3. Cohorte EcTAUsome

Les plasmas et LCR de la cohorte EcTAUsome ont été obtenus prospectivement. La cohorte ecTAUsome est une cohorte prospective constituée de 5 groupes de 20 patients. Les critères d'inclusion et d'exclusion sont listés ci-dessous. Un seul prélèvement de sang et de LCR est réalisé. Avant le prélèvement de LCR et de sang le patient répond à un questionnaire sur les plaintes mnésiques et subit un test MMSE. Le fractionnement vésiculaire à partir de plasmas et LCR est effectué immédiatement après le prélèvement afin d'éviter la congélation, qui dégrade partiellement les VE. Une partie des différentes fractions est immédiatement analysée par NTA (nanoparticule tracking analysis) sur l'appareil Nanosight (Malvern®, Orsay, France). La seconde partie des différentes fractions est cryopreservée et sera utilisée pour une quantification de la protéine tau phosphorylée ou non phosphorylée par ELISA (Phospho(Thr231)/Total Tau Kit ; meso scale diagnostics) et une étude en spectrométrie de masse, afin de déterminer le contenu vésiculaire.

a. Critères d'exclusion :

- Sujets présentant une démence liée à une pathologie non dégénérative, incluant les démences vasculaires ;
- Pathologies concomitantes :
 - Sujets présentant une autre pathologie neurodégénérative, notamment une démence fronto-temporale (DFT), une démence à corps de Lewy (DCL) ou une maladie de Parkinson ;
 - Sujets présentant d'autres troubles neurologiques majeurs, notamment tumeur cérébrale, accident vasculaire cérébral, épilepsie, hydrocéphalie ou toute autre pathologie qui contraindiquerait, selon le jugement de l'investigateur, la participation à l'étude ;
 - Sujets présentant une maladie démyélinisante du système nerveux périphérique, notamment un syndrome de Guillain-Barré ;
- Critères biologiques :
 - Sujets présentant une pathologie connue due aux virus suivants : Hepatitis C Virus (HCV), Hepatitis B Virus (HBV) ou Human Immunodeficiency Virus (HIV) ;
 - Sujets présentant des anomalies biologiques cliniquement significatives, selon le jugement de l'investigateur ;
- Autres :
 - Sujets présentant une addiction ou un abus d'alcool ou de drogues ;
 - Sujets présentant une contre-indication à la réalisation d'une ponction lombaire ;
 - Sujets qui sont susceptibles de ne pas accepter les procédures de l'étude ou toute autre raison qui serait détectée par l'investigateur (par exemple, personne non joignable en cas d'urgence).

- b. Critères d'inclusion communs :
- Hommes et femmes âgés de 50 à 80 ans inclus au moment de la visite de sélection. –
 - Sujets à même de subir une ponction lombaire.
 - Sujets ayant un accompagnant.
 - Sujets et accompagnant capables de se conformer au protocole et de donner leur consentement éclairé et de comprendre le sujet de l'information.
 - Sujets enregistrés auprès de la Sécurité Sociale française, en accord avec la législation française sur l'expérimentation biomédicale.
- c. Critères d'inclusions spécifiques aux groupes :

Tableau 2 : groupes de la cohorte EcTAUsome et critères d'inclusion spécifiques aux groupes

Numéro de groupe	Nom du groupe	Critères d'inclusion spécifiques aux groupes
1	Contrôles	Absence de plainte mnésique Absence de troubles cognitifs : MMSE>27 Statut ApoE4 inconnu Pas d'antécédents familiaux de démence au premier degré
2	Asymptomatiques avec haut risque de développer une MA	Absence de plainte mnésique Absence de troubles cognitifs significatifs : MMSE>27 Statut ApoE4 connu (4+/4+ ou 4+/4-) ou antécédents familiaux de démence de type Alzheimer
3	Plainte mnésique (no MCI)	Présence d'une plainte cognitive Absence de trouble cognitive objectivé par un score MMSE >27 et un examen neuropsychologique standard normal (évaluation < 1 an)
4	MCI (Mild Cognitive Impairment)	Troubles significatifs de la mémoire épisodique d'apparition progressive depuis plus de 6 mois Au moins un des critères suivants : Atrophie médiale temporale sur imagerie IRM Concentration diminuée de la protéine Ab42 et concentration augmentée de la protéine Tau dans le LCR Hypométabolisme bilatéral temporopariétal visible en TEP-FDG Marquage amyloïde positif en TEP si disponible Exclusion d'autres diagnostics différentiels
5	Démence d'Alzheimer	Déclin cognitive significatif et progressif depuis plus de 6 mois Présentation amnésique ou multidomaine Exclusion d'autres diagnostics différentiels MMSE compris entre 15 et 26 (inclus)

II. Méthodes

A. Extraction du liquide interstitiel cérébral

Cette procédure est adaptée du protocole publié précédemment par Polanco *et al.* Pour les cerveaux humains, un fragment d'environ 1g a été prélevé dans la zone d'intérêt à partir de l'hémi-cerveau cryopreservé dans la Neurobanque de Lille. Les régions sélectionnées étaient : aire de Brodmann 18 (lobe occipital, visuel secondaire), aire de Brodmann 8/9 (lobe frontal, associatif) et cervelet intermédiaire comprenant du cortex et du noyau dentelé. Pour les souris, le cerveau entier a été utilisé. Ces tissus ont été incubés sur glace dans 5 ml d'Hibernate-A (NaF 50 mM, Na₃VO₄ 200 nM, inhibiteur de protéase 10 nM (E64, Sigma® et cocktail inhibiteur de protéase, Roche®)). Après homogénéisation douce dans un tube de Potter, nous avons ajouté 2 ml de papaïne (LS003119, Worthington®) dilués dans Hibernate-A (20 unités/ ml). L'homogénat est laissé en incubation pendant 20 minutes à 37°C sous agitation. 15 ml de tampon Hibernate-A à 4°C sont ensuite ajoutés et mélangés afin de stopper l'activité enzymatique. Les cellules et débris ont été culottés par centrifugations successives à 4°C (300, 2000 et 10 000 g). Le surnageant final et les différents culots ont été cryopreservés à -80°C jusqu'à utilisation.

B. Caractérisation des vésicules extracellulaires murines et humaines

1. Fractionnement vésiculaire par chromatographie d'exclusion de taille.

Les procédures pour enrichir les VE à partir de fluides murins ou humains ont été appliquées conformément au MISEV (Minimal information for studies of extracellular vesicles), une directive établie et mise à jour en 2018 par la communauté internationale des VE (220). Nous avons sélectionné le système SEC comme une méthode à haute spécificité qui a permis l'enrichissement des VE avec peu de composants non vésiculaires (Thery *et al.*, 2018). Des colonnes SEC maison ont été utilisées et pour respecter cette directive, nous avons analysé la taille et le nombre de particules par diffusion de la lumière (NTA), déterminé la quantité totale de protéines et enfin, vérifié la présence de protéines spécifiques associées aux VE: catégorie 1 (la tétraspanine tissulaire non spécifique CD63; protéine transmembranaire), catégorie 2 (HSP90 et Tau, protéines cytosoliques récupérée dans les VE), catégorie 3 (quantité globale de protéines) comme recommandé par le MISEV (Thery *et al.*, 2018).

Nous avons utilisé des colonnes de 10ml contenant de la sépharose CL2B Millipore® comportant des pores de 75nm. Le fractionnement est effectué à partir de 500 µl de fluide dans un tampon phosphate salin (PBS). Les 3 premiers ml correspondaient à du volume vide. Les 20 fractions de 500µl suivantes ont été récupérées. Les fractions ont été conservées à -20 °C.

2. Analyse des vésicules par diffusion de lumière (NTA, nanoparticules tracking analysis).

L'analyse des différentes fractions a été effectuée sur l'appareil Nanosight NS300 (Malvern®, Orsay, France) avant congélation. Pour générer des données statistiques, cinq vidéos de 90 secondes ont été réalisées et analysées à l'aide du logiciel NTA (version 3.2 ; NanoSight Ltd.) permettant de compter les particules en fonction de leur taille.

3. Microscopie électronique

Les fractions 1 à 4 recueillies par chromatographie d'exclusion de taille ont été réunies puis concentrées sur colonne amicon ultra 3K (Merck Millipore®) jusqu'à obtention d'un volume final de 50 µl. 5 µl d'échantillon ont été déposés sur une grille de carbone (400 mesh) et incubés pendant 20 min à température ambiante. Le contenu de la grille est ensuite fixé 5 minutes à température ambiante dans du PBS-Glutaraldéhyde (1%). Les grilles sont rincées à l'eau distillée puis incubées dans 1% d'acétate d'uranyle pendant 10 minutes puis dans 1% d'acétate d'uranyle / méthylcellulose 2% pendant 10 minutes à 4°C. Les grilles sont ensuite observées au microscope électronique à transmission (Zeiss EM900®).

Pour le marquage immunogold, 5 µl d'échantillon ont été déposés sur une grille de carbone (400 mesh) et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. Le contenu de la grille est ensuite fixé dans le paraformaldéhyde (PFA) 2%, la grille rincée en PBS-Glycine. La fixation est suivie d'une étape de saturation au PBS - albumine sérique bovine (BSA) 1% - sérum de chèvre (NGS) pendant 1 heure à température ambiante puis d'une incubation avec l'anticorps primaire dilué dans le PBS BSA 1% -NGS et rincé dans PBS-BSA 0,1%. Les grilles ont ensuite été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à de l'or colloïdal (12nm) dilué au 1/20 puis rincées dans du PBS. Le contenu de la grille est ensuite fixé 5 minutes à température ambiante dans du PBS-Glutaraldéhyde (1%). Les grilles sont rincées à l'eau distillée puis incubées dans 1% d'acétate d'uranyle pendant 10min puis dans 1% d'acétate d'uranyle / méthyl cellulose 2% pendant 10 minutes à 4°C. Les grilles sont ensuite observées au microscope électronique à transmission (Zeiss EM900®).

4. Western-blot

Les échantillons sont chauffés pendant 10 minutes à 100°C puis déposés dans un gel 4-12% Bis-Tris NuPAGE Novex (Invitrogen®). Le transfert est ensuite réalisé sur une membrane de nitrocellulose ou de polyvinylidène difluorure (PVDF) de 0,45 µm, en utilisant le Système Novex de Life Technologies® (module de transfert XCell II). Ensuite, la membrane est incubée pendant une heure avec une solution de blocage, puis une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, et pour terminer pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire approprié (Ab conjugué HRP 1/50 000). Le signal a été visualisé en utilisant des réactifs de détection ECL Western Blot (GE Healthcare®).

5. Colorations à l'argent de gels de protéines

Les échantillons sont chauffés 10 min à 100°C, déposés dans un gel 4-12% Bis-Tris NuPAGE® Novex® (Invitrogen). Le gel a été fixé pendant une nuit après migration dans 40% d'éthanol, 10% d'acide acétique. La révélation protéique à l'argent a été réalisée à l'aide du kit de coloration PlusOne (GE Healthcare).

C. Détection d'espèces toxiques de tau dans les vésicules extracellulaires murines et humaines

1. *In-vitro*

a. Culture des lignées cellulaires

Les cellules TauRDP301SFRET Biocaptor (ATCC CRL-3275) et les cellules HEK293T ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié par Dulbecco, additionné de 10% de sérum bovin foetal (SVF), 1% de pénicilline /streptomycine, 1% de glutamax et sans Hepes. Les cellules ont été maintenues dans un incubateur humide à 37°C avec 5% de CO₂.

b. Test cellulaire de recrutement e tau (FRET) (protocole modifié de Holmes et al., 2014) (figure 7)

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 12 puits (150 000 cellules par puits) pendant 24 heures avant le traitement. 2 µM de fibrilles K18 soniquées ont été utilisées comme contrôle positif et du PBS comme contrôle négatif. Les fractions vésiculaires 1 à 4 ont été regroupées et concentrées dans des colonnes amicon-3K jusqu'à obtention volume de 50µl. La fraction vésiculaire concentrée est ensuite mélangée au transfectant (50 µl EVs + 50 µl optiMEM plus 10 µl de lipofectamine-2000 + 90 µl d'optiMEM) puis laissée en incubation 20 minutes à température ambiante avant d'être ajoutée au milieu de culture des cellules. 72 heures plus tard, les cellules sont décollées puis rincées au PBS et incubées 30 minutes à température ambiante avec le kit de viabilité Zombie NIRTM dilué au 1/200 (Biolegend®). Après un rinçage dans du PBS, les cellules ont été fixées dans 2% de PFA pendant 10 minutes à température ambiante puis suspendues dans du PBS pour des analyses de cytométrie à l'aide du cytomètre Aria SORP BD Biosciences® (logiciel d'acquisition FACS DIVA V7.0 BD biosciences®) en utilisant les longueurs d'onde d'excitation/émissions suivantes : excitation (CFP) 405nm et détection (YFP) 529 +/- 30 nm. Les données FRET ont été quantifiées à l'aide du logiciel d'analyse KALUZA v2. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives FRET x MFI / cellules viables.

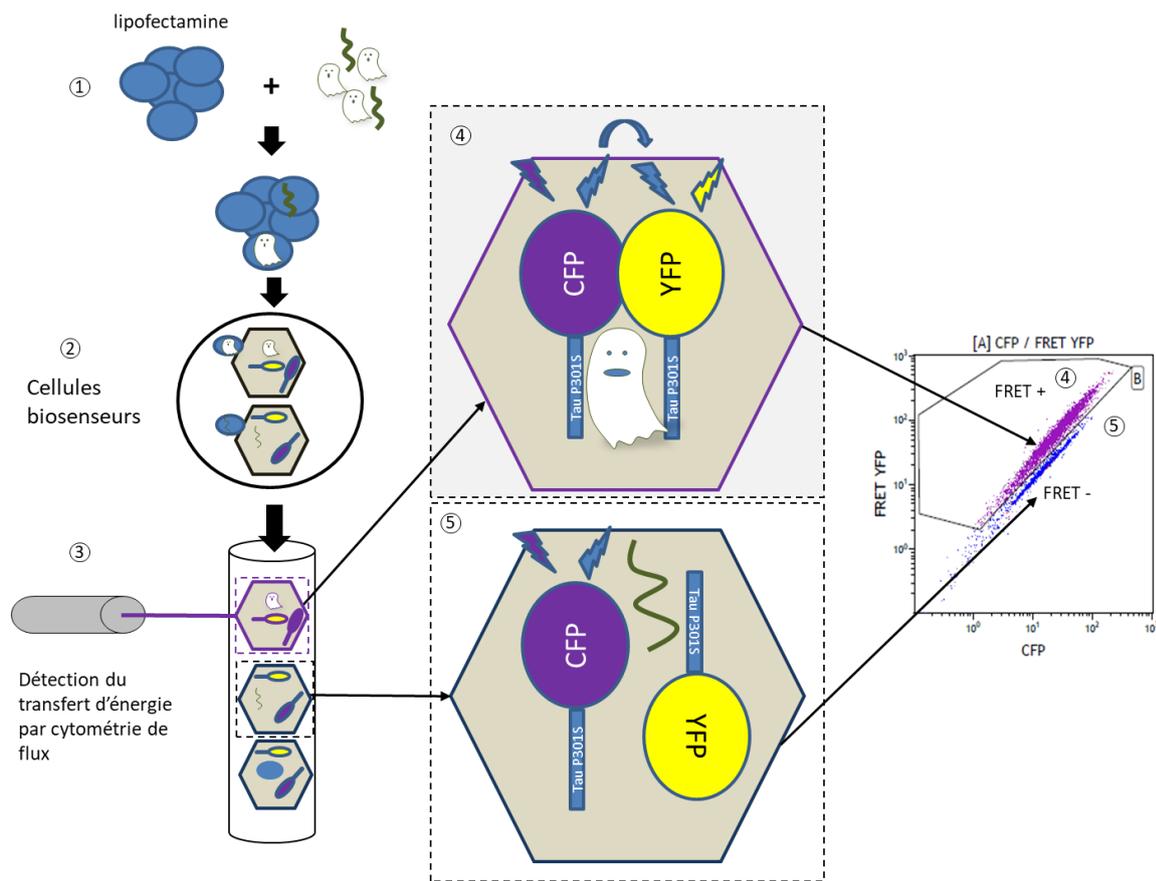


Figure 7 : Système biosenseur de détection du potentiel de recrutement Tau.

Le produit a testé est transfecté dans les cellules TauRDP301SFRET exprimant un fragment de Tau mutée P301S couplé à la CFP ou la YFP (1). Après 72h d'incubation les cellules sont décollées et fixées (2). La mesure du signal FRET se fait en cytométrie de flux (3). En cas de présence de Tau avec potentiel de recrutement les fragments couplés aux fluorophores se rapprochent. Cela permet un transfert d'énergie et un signal FRET positif (4). S'il n'y a pas de recrutement des fragments, le signal FRET est négatif (5).

c. Production des fibres recombinantes K18

La protéine recombinante Tau K18 est mélangée à de l'héparine avec un rapport de 4/1 dans un tampon proagrégant (Hepes 10 mM pH 6,9 NaCl 1000 mM) pour une concentration finale en protéines de 8 μ M puis incubée 48 heures à 37°C. L'agrégation a été confirmée par ajout de 50 μ M de thioflavine T dans 100 μ l de solution protéique.

2. In-vivo

a. Injections stéréotaxiques

Des injections stéréotaxiques de VE ont été réalisées de façon bilatérale dans l'hippocampe de souris TgTau30 et de souris contrôles âgées d'un mois. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées par rapport à la fontanelle bregma étaient : antéropostérieure: -2,5 mm; médio-latérale: +1 mm et -1mm; dorso-ventrale: -1,8 mm. La procédure d'injection consistait à positionner la souris anesthésiée (kétamine 100mg/kg, xylazine 20mg/kg) dans le cadre stéréotaxique, à inciser le scalp, à fraiser le crâne, à positionner une seringue en verre Hamilton de 10 μ l à aiguille fixe selon les coordonnées stéréotaxiques, puis à injecter 2 μ l à un débit de 0,25 μ l/min. Après injection, l'aiguille a été laissée en place pendant 5 minutes pour éviter toute fuite du produit injecté.

b. Sacrifice des animaux et procédures de préparation des tissus

Quatre semaines post-injection, les souris TgTau30 et contrôles ont été anesthésiées et perfusées par voie transcardiaque avec une solution saline à 0,9% à 4°C puis de la solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 10 minutes. Les cerveaux ont été immédiatement prélevés, fixés pendant une nuit dans du PFA à 4%, lavés dans du PBS, placés dans du saccharose à 20% pendant 24 h et cryopréservés à -80°C jusqu'à utilisation. Nous avons ensuite réalisé au cryostat des coupes flottantes (40 µm d'épaisseur) dans le plan coronal.

c. Immunohistochimie (IHC) sur coupes flottantes et quantification du marquage

Les coupes flottantes ont été rincées dans du PBS-Triton X-100 à 0,2% puis traitées pendant 30 minutes à température ambiante avec 0,3% de H₂O₂. L'étape de saturation des épitopes non spécifiques a été réalisée en utilisant le réactif «Mouse in Mouse» (Vector Laboratories®) dilué au 1:100 dans du PBS, pendant 60 min à température ambiante. Après 3 rinçages dans du PBS-Triton X-100 à 0,2%, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire MC1 dilué au 1 :1000 dans du PBS-Triton X-100 à 0,2% pendant une nuit à 4°C. Après 3 rinçages dans du PBS-Triton X-100 à 0,2%, le marquage a été amplifié par incubation avec un anticorps IgG anti-souris biotinylée (Vector Laboratories®) dilué au 1:400 dans du PBS-Triton X-100 0,2%, pendant 60 minutes à température ambiante suivie d'un rinçage et d'une incubation de 120 minutes dans de l'avidine-biotine-HRP (kit ABC, Vector Laboratories®) dilué au 1 :400 dans du PBS. Les coupes sont ensuite rincées et traitées avec du tétrahydrochlorure de diaminobenzidine (Vector Laboratories®) dilué dans un tampon Tris-HCl 0,2 mol/L, pH 7,6 contenant 30% de H₂O₂. Les coupes de cerveau ont ensuite été montées sur lames, séchées à l'air, déshydratées dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70%, 95%, 100%) et de toluène, et finalement montées avec du Vectamount (Vector Laboratories®).

La quantification du marquage était faite en aveugle à l'aide d'un logiciel de stéréologie (système d'analyse d'images Mercator; Explora Nova®, La Rochelle, France) Les seuils ont été établis manuellement à l'aide d'objets identifiés sur un ensemble d'images en utilisant le spectre de couleur, l'intensité et le contraste. Les seuils de segmentation sont restés constants tout au long de l'analyse. La quantification s'est faite sur la région CA1 de l'hippocampe sur les coupes cérébrales successives couvrant tout l'hippocampe (bregmas -1,7, -2,06, -2,46, -2.80, -3,16, -3,52). Les résultats sont présentés en pourcentage de surface positive / surface totale CA1 analysée.

D. Immunohistochimie (IHC) sur tissus humains et quantification du marquage

Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur des coupes de tissus cryopréservés puis fixés par le formol pendant 24 heures et inclus en paraffine, de 4µm d'épaisseur sur un automate Benchmark Ultra (Roche Tissus Diagnostics®) en utilisant le kit de détection UltraView DAB IHC (Ventana®) et l'anticorps primaire AT8. Les blocs de paraffines correspondaient au miroir du tissu utilisé pour l'extraction d'ISF.

La quantification du marquage a été réalisée en aveugle à l'aide du logiciel QuPath-0.2.1, sur lames scannées. Les seuils ont été établis grâce à un algorithme d'intelligence artificielle (Réseau neuronal artificiel (ANN_MLP)) utilisant des objets identifiés sur un jeu de lames, et ces seuils de segmentation sont restés constants tout au long de l'analyse. La quantification est effectuée sur toute la surface de la lame. Les résultats sont exprimés en pourcentage de lésions Tau ((nombre de pixels positifs / nombre de pixels toTaux) x100).

E. Transfert de protéine Tau de neurone à astrocyte

1. Culture primaire d'astrocytes :

Les nouveaux-nés de souris sont sacrifiés entre J1 et J2 de vie. Le cerveau est extrait et l'hippocampe disséqué sous loupe binoculaire. Les méninges sont décollées et les hippocampes temporairement stockés dans du milieu de culture (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco® by Life Technologies®) + 10% de sérum de veau fœtal + antibiotiques et antimycotiques Sigma®, A5955) à 4°C. Le tissu est ensuite dissocié mécaniquement à l'aide d'une seringue et d'aiguilles de diamètre décroissant (19, 21 et 25 gauges) par 3 aspirations / refoulements pour chaque diamètre d'aiguille. 100 000 cellules / puits sontensemencées dans des plaques 6 puits (9,6cm²/puits) dans 3ml de milieu de culture. Les plaques sont mises à incuber à 37°C, 5% CO₂ pendant 3 semaines. Le milieu est changé 1 fois par semaine après rinçage au PBS (phosphate buffer saline) et après avoir tapé la boîte de culture sur la paillasse afin de décoller la microglie et les oligodendrocytes.

2. Culture primaire de neurones :

Les femelles gestantes sont sacrifiées à 17 jours de gestation et les fœtus extraits de l'utérus et de la poche amniotique. Le cerveau est extrait de la boîte crânienne, l'hippocampe disséqué sous loupe binoculaire puis immergé dans du milieu de culture à 4°C. Les tissus sont ensuite digérés à la papaïne pendant 10 minutes puis à la trypsine pendant 7,5 minutes puis dissociés mécaniquement grâce à des aspirations / refoulements à l'aide d'une pipette P1000. Un million de cellules estensemencé par puits dans des plaques 6 puits (9,6cm²/puits) préalablement traitées par de la laminine et de la poly-D-lysine diluées dans 3ml de milieu de culture (Neurobasal + B27 + pénicilline streptomycine). Les plaques sont mises à incuber à 37°C, 5% CO₂ pendant 3 semaines.

3. Infection par vecteur lentiviral

Le vecteur lentiviral utilisé code pour l'isoforme humaine de Tau V5-h1N4R ou Tau V5-h1N3R avec insertion d'une séquence V5 (117). L'infection est réalisée à DIV5 (day in-vitro) à une concentration de 60ng de protéine p24 pour 1 x 10⁶ cellules en additionnant les vecteurs au surnageant. La titration du nombre de particules physiques se fait par technique ELISA p24 (RETROtek, ZeptoMetrix Corporation®). La protéine p24 est une protéine de la capsid virale. Ainsi, le dosage p24 dose les particules physiques et non les particules infectieuses.

4. Culture en chambre microfluidique (figure 8)

Des lamelles de verre ont été prétraitées pendant la nuit à 4°C avec de la poly-D-Lysine à 0,5mg/mL. Les chambres microfluidiques (AXIS®, Temecula, CA) ont ensuite été collées sur les lamelles de verre. Les neurones sont obtenus à partir de cultures primaires de neurones d'embryons de rates gestantes comme décrit précédemment. Les progéniteurs neuronaux sont injectés dans le compartiment somato-dendritique à une concentration de 25 x 10⁶ cellules/mL. Les astrocytes obtenus à partir de culture primaire de rate (1 jour post-natal, P1) et préalablement cultivés en flasque T75 (15DIV) sont injectés dans le compartiment axonal à

une concentration de 5×10^5 cellules/mL dans du milieu de culture utilisé pour les cultures primaires de neurones. Les neurones sont maintenus 7 jours à 37°C pour la différenciation et la pousse axonale dans les microcanaux guidés par un flux (généralisé par une différence de pression) du compartiment somato-dendritique au compartiment axonal. Le flux du milieu est inversé (compartiment axonal vers le compartiment somato-dendritique) et les neurones sont alors infectés avec un vecteur lentiviral V5-h1N4R (50ng de p24 par chambre microfluidique). Les cultures sont maintenues à 37°C et sous 5% de CO₂ pendant 7 jours avant fixation au paraformaldéhyde (PFA) et immuno-marquage avec les anticorps anti-V5 et Glial fibrillary acidic protein (GFAP).

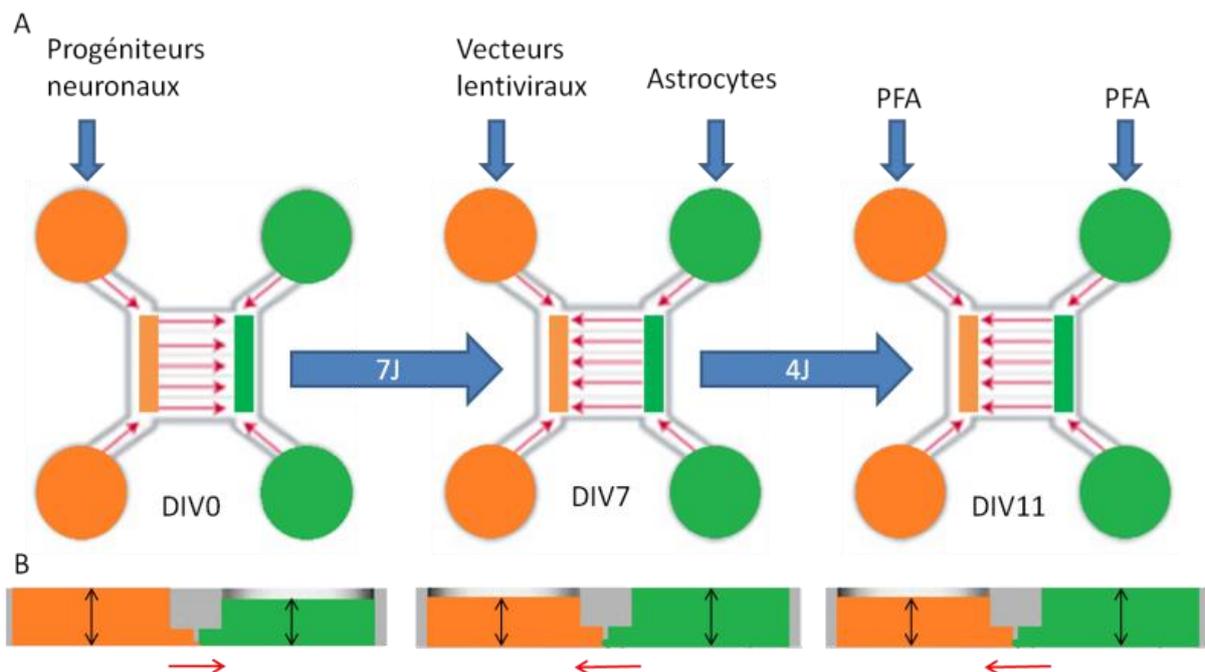


Figure 8 : Principe de la culture en chambre microfluidique

A: Le compartiment somatodendritique (orange) est séparé du compartiment axonal (vert) par des microcanaux ($L=150\mu\text{m}$, $l=10\mu\text{m}$, $h=5\mu\text{m}$). Le flux dans les microcanaux, indiqué par les flèches rouges, est modulé par la pression hydrostatique engendrée par la hauteur de liquide dans les puits représentés en B. 1: Les progéniteurs neuronaux sont ensemencés dans le compartiment somatodendritique. Les astrocytes sont ensemencés dans le compartiment axonal. Les progéniteurs neuronaux se différencient ensuite pendant 7 jours. La guidance axonale dans les microcanaux se fait par le flux. A DIV7, les axones ont poussé dans le compartiment axonal. Le flux est alors inversé, et les neurones infectés dans le compartiment somatodendritique par le lentivirus V5-h1N4R ou V5-h1N3R. Après 7 jours d'incubation la culture est fixée.

5. Microscopie confocale

Le microscope utilisé est le confocal inversé Zeiss LSM 710. Pour chaque lame, des images de fluorescence ont été acquises avec 3 longueurs d'onde d'excitation différentes. Le pinhole est ajusté pour assurer une profondeur de champ minimale. Les objectifs utilisés sont les 40x, 63x et 100x. L'épaisseur de coupe est comprise entre 0,3 et $1\mu\text{m}$. La puissance laser ainsi que les photomultiplicateurs sont réglés pour chaque longueur d'onde afin de n'avoir aucun signal visible sur les lames témoins.

6. Transfert des fractions enrichies en ectosomes, exosomes et Tau libre à partir du milieu conditionné (figure 22a)

Les neurones sont obtenus à partir de cultures primaires de neurones d'embryons de rats comme décrit précédemment et sont cultivés en plaques 6 puits. Ils ont été infectés à DIV5. A DIV21, le milieu de culture conditionné par les neurones a été regroupé, centrifugé à 2000g pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Les VE sont ensuite concentrées par ultracentrifugations successives à 20 000g (fraction enrichie en ectosomes) et 100000g (fraction exosomes). Le surnageant contenant les protéines libres est concentré dans des tubes Amicon 5k. Les différentes fractions sont redistribuées sur les cultures astrocytaires. Les cultures astrocytaires ont été incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 6 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures.

Après incubation, le milieu de culture a été prélevé, les cellules lavées 3 fois dans du PBS à 37°C puis lysées dans du tampon RIPA (150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% désoxycholate de sodium, 0,1% désoxycholate de sodium, et 50 mM de Tris-HCl; pH=8,0) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmplete mini, Roche®) pour les analyses ELISA, ou du tampon Quiazol pour les analyses moléculaires.

7. Spectrométrie de masse (MS).

Les culots de VE ont été remis en suspension dans du PBS puis traité à la trypsine. Les analyses MS ont été effectuées par Protein Analysis Facility (University of Lausanne) avec une analyse LC-MS / MS Shotgun. Avec cette technique, les peptides sont séquencés puis comparés à des bases de données de séquences protéiques connues (MASCOT MS / MS Logiciel). Nous avons considéré les protéines affichant au moins 4 spectres dans au moins 1 échantillon. Les noms de gènes associés aux protéines d'intérêt sélectionnées sont issus de la base de données Vesiclepedia et RGD (221,222).

8. ELISA (figure 25a)

Le dosage de Tau étiquetée V5 a été déterminé par la technique Elisa en sandwich après modification du kit INNOTEST hTau Ag (Fujirebio/Innogenetics®, Belgium) utilisé pour doser Tau dans les fluides biologiques humains. Dans le cas présent, nous avons remplacé l'anticorps AT120 de capture par l'anticorps anti-V5 (plaques 96 puits prétraitées pendant la nuit avec l'anticorps anti-V5 dilué au 1/1000 dans du tampon carbonate (NaHCO₃ 0,1mM + Na₂CO₃ 0,1mM, pH=9,6). Les anticorps de détection utilisés dans ce kit sont les anticorps biotinylés HT7 et BT2 reconnaissant deux épitopes centraux de Tau. La gamme standard est faite à partir de protéine Tau-V5 recombinante.

9. Analyse en qPCR

a. Extraction des ADNs totaux

Les cellules ont été récupérées dans 100µl de Qiazol Lysis Reagent puis conservées à -80°C. Les ADN totaux ont été extraits à l'aide du kit miRNeasy (Qiagen®). Avant utilisation, la quantité et la pureté des ARNs ont été déterminées par mesure des densités sur le spectromètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®).

b. PCR quantitative

Tous les résultats présentés dans cette étude sont basés sur le 2 × Multiplex PCR Master Mix (Qiagen®), utilisant des dosages qPCR qLV et qPCBP2 dans des réactions de 25 µl en triplicate (1 × Master Mix, 250 nM pour chaque sonde et 300 nM pour chaque amorce), et le système de PCR en temps réel rapide 7900HT utilisant SDS v2.4 et les programmes PCR standards : 2 min 50°C, 10 min 95°C, 40 × (15 s 95°C, 1 min 60°C).

Tableau 3 : Sondes de qPCR

<i>Test qPCR</i>	<i>Cible</i>	<i>Fonction</i>	<i>Séquence (5' to 3')</i>
qLV	HIV gag	FW	TCTCGACGCAGGACTCG
		RV	TACTGACGCTCTCGCACC
		Probe	<i>Yakima-Yellow-ATCTCTCTCCTTCTAGCCTC-ZNA₄-BHQ1</i>
qPCBP2	PCBP2 IVS 13	FW	TTGTGTCTCCAGTCTGCTTG
		RV	AGGTGGTGGTGGTGGTA
		Probe	FAM-CCCTCTCCTGGCTCTAAATGTTGTGT-BHQ1

Abbreviations: BHQ1, black hole quencher-1; FAM, 6-carboxyfluorescein; FW, forward primer; IVS, intervening sequence; probe, 5' fluorescently labeled and 3' quencher-linked probe; RV, reverse primer; ZNA, zip nucleic acid cationic spermine residues.

Le dosage qLV est basé sur les séquences reconnaissant la séquence gag du plasmide vecteur de transfert MA821T87Q et des sites d'intégration proviraux. Le test qPCBP2 reconnaît une région intronique PCBP2.

10. Analyses statistiques

Les données ont été décrites comme moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM). Les comparaisons ont été effectuées en utilisant soit le test de comparaisons multiples non paramétrique de Kruskal-Wallis avec correction du risque α soit le test t de Student. Les tests statistiques ont été effectués au niveau α bilatéral de 0,05. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel PRISM 8.

Tableau 4 : Tableau de correspondance de matériels et des méthodes correspondant aux sections I et II des résultats

Méthodes	Matériels
Extraction du liquide interstitiel cérébral	Tissu cérébral murin (Tg30TAU n=23, WT n=24, APP/PS1 n=5) Tissu cérébral humain (aires BA8/9, 17 et cervelet) 10 MA, 5 PiD, 5 PSP, 5 Témoins
Fractionnement vésiculaire par chromatographie d'exclusion de taille.	ISF murins (Tg30TAU n=23, WT n=24, APP/PS1 n=5) ISF humains (aires BA8/9, 17 et cervelet) 10MA, 5PiD, 5PSP
NTA	plasmas humains (ecTAUsomes n=37 ; non ecTAUsomes : contrôles n=13, MA=28), LCR (ecTAUsomes n=37 ; non ecTAUsomes : controles n=30, MA=34)
Microscopie électronique	ISF murins (pool de 5) ISF humains (pool de 5)
Colorations à l'argent de gels de protéines	plasmas humains (pool de 5) LCR (pool de 5)
Western-blot	ISF murins (HSP90, α -tubuline, Histone H3)
Test FRET	ISF murins (Tg30TAU n=23, WT n=24, APP/PS1 n=5) ISF humains (aires BA8/9, 17 et cervelet) 10MA, 5PiD, 5PSP Plasmas humains (ecTAUsomes n=37 ; non ecTAUsomes : contrôles n=13, MA=28), LCR (ecTAUsomes n=37 ; non ecTAUsomes : controles n=30, MA=34)
Injections stéréotaxiques	Tg30 Tau (ISF AD n = 10, ISF Ctl n=10) WT (ISF AD n = 10, ISF Ctl n=10)
Immunohistochimie (IHC) sur coupes flottantes et quantification du marquage	Tissu cérébral murin Tg30 Tau (ISF AD n = 10, ISF Ctl n=10) WT (ISF AD n = 10, ISF Ctl n=10)
Immunohistochimie (IHC) sur tissus humains et quantification du marquage	Tissu cérébral humain (aires BA8/9, 17 et cervelet) 10 MA, 5 PiD, 5 PSP, 5 Témoins

Tableau 5 : Tableau de correspondance de matériels et des méthodes correspondant à la section III des résultats

Méthodes	Matériels
Infection par vecteur lentiviral	Cultures primaires de neurones murins
Culture en chambres microfluidiques	Cultures primaires de neurones et astrocytes murins (n=2 par condition expérimentale)
Extraction des VE par ultracentrifugation	Surnageant de cultures primaires de neurones murins (n=6 par condition expérimentale)
NTA	VE extraites du surnageant de cultures primaires de neurones murins (n=3)
Transfert des fractions enrichies en ectosomes, exosomes et Tau libre à partir du milieu conditionné	Cultures primaires de neurones et astrocytes murins (n=3 par condition expérimentale)
ELISA V5	Culots astrocytaires
PCR quantitative	Cultures primaires de neurones et astrocytes murins (n=3 par condition expérimentale)

RÉSULTATS

I. Les vésicules extracellulaires comportent-elles de la protéine Tau ayant un potentiel de recrutement ?

Si la transmission de la pathologie selon un mécanisme de type prion semble maintenant établis, peu de données sont disponibles sur les modes de transfert intercellulaire des espèces pathologiques. Nous savons que, du point de vue physiologique, la protéine Tau est sécrétée dans les VE. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle les espèces pathologiques de protéines Tau pouvaient se propager, au moins en partie, *via* les VE du milieu interstitiel cérébral. Dans un second temps nous avons voulu savoir si ces VE étaient transférées dans le LCR et/ou dans le sang. La première partie de ce travail est centrée sur l'étude du rôle des VE dans la propagation d'espèces de protéines Tau ayant des propriétés de recrutement.

L'ensemble de cette partie reposant sur l'étude des VE, nous avons débuté par une caractérisation des fractions enrichies en VE à partir de différents fluides murins et humains.

A. Caractérisation des fractions enrichies en VE :

La présence de nombreux agrégats de protéines Tau et donc de macroprotéines dans les tissus nous imposait d'utiliser une méthode permettant de séparer les VE des macroprotéines, raison pour laquelle nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) (223) et non pas la technique classique d'ultracentrifugation (224).

Les VE ont été extraites par SEC à partir de plasmas et de LCR humains (prélevés du vivant du patient ou en *post-mortem* par ponction lombaire (LCR-PL) ou en *post-mortem* par ponction intraventriculaire (LCR-V)), et d'ISF de cerveaux humains et murins. Pour chaque fluide, les différentes fractions d'exclusion ont été analysées.

1. Analyse par suivi des nanoparticules (Nanosight) :

La mesure de la concentration et de la distribution selon la taille des particules a été réalisée à l'aide d'une analyse de suivi des nanoparticules (nanoparticules tracking analysis ; NTA).

Les vésicules extracellulaires étaient majoritairement présentes dans les fractions 1 à 5 pour l'ensemble des fluides étudiés (figures 10a à 10d), excepté pour le plasma pour lequel des VE étaient présentes en grande quantité de la fraction 2 à 9 (figure 10e).

Pour le LCR-PL (figure 9c), la SEC a permis d'obtenir des fractions enrichies en grandes VE (contenues dans les fractions de SEC 1 et 2) et en petites VE (contenues dans les fractions de SEC 3 et 4). Par contre, la SEC n'a pas permis une bonne séparation pour le LCR ventriculaire (figure 9d), l'ISF humain (figure 9b) et murin (figure 9a), et le plasma (figure 9e). En effet l'ensemble des fractions de SEC issues du plasma comportent une majorité de petites VE alors que l'ensemble des fractions issues de l'ISF ou du LCR ventriculaire comportent une majorité de grandes VE.

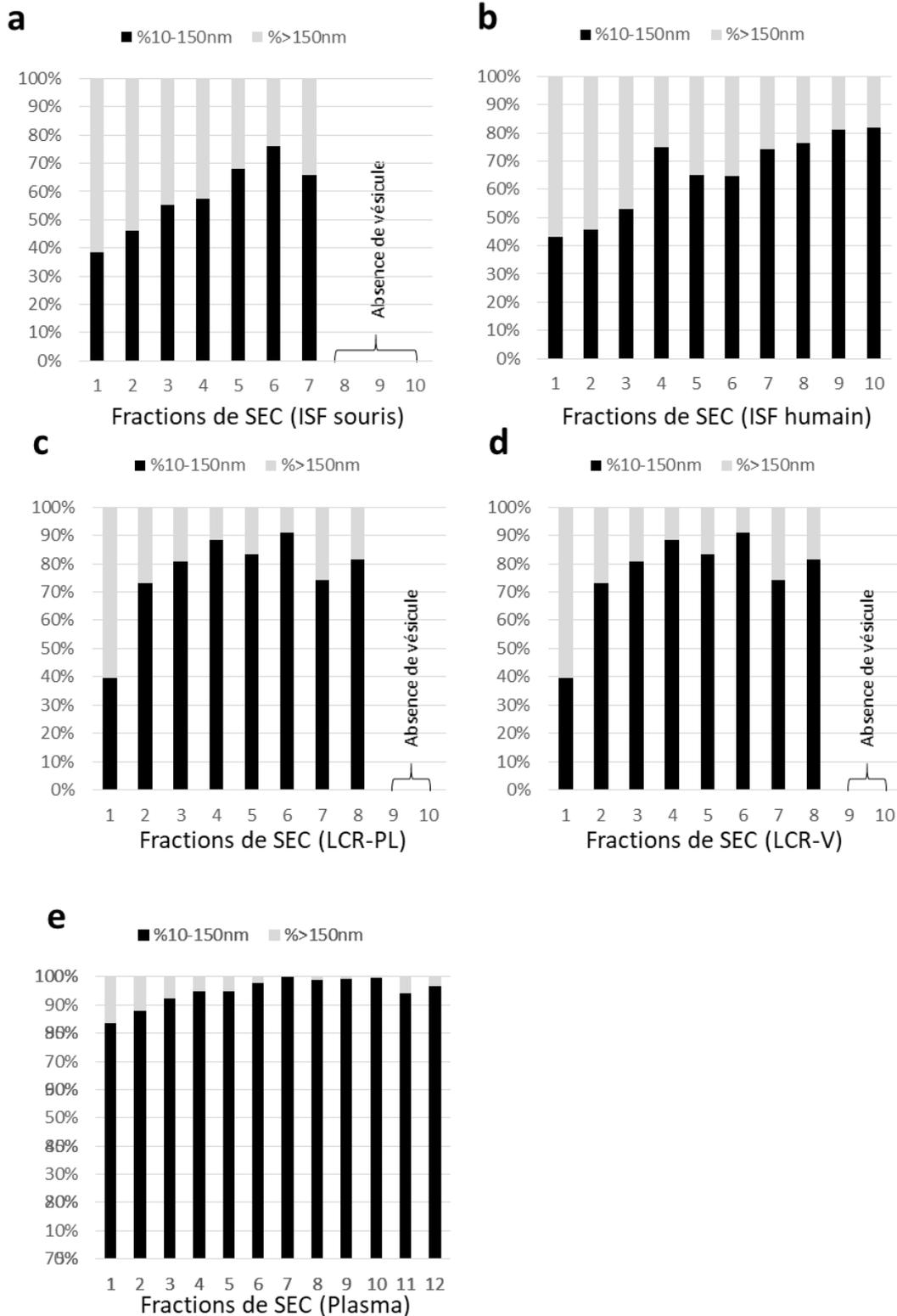


Figure 9 : Répartition des vésicules en fonction de leur taille dans les différentes fractions de SEC.

Les différents fluides ont été fractionnés par SEC puis les différentes fractions analysées par NTA. Les histogrammes représentent la répartition par taille (10-150 nm en noir ou >150 nm en gris) des particules présentes dans les différentes fractions de SEC des différents fluides extracellulaires (a : ISF de cerveau de souris ; b : ISF de cerveau humain ; c : LCR-PL ; d : LCR-V ; e : plasma). Les particules de 10 à 150 nm sont principalement représentées par des exosomes alors que les vésicules de plus de 150 nm sont principalement représentées par les ectosomes.

2. Dosage protéique

Dans les différentes fractions issues de LCR-PL ou ventriculaire, les protéines sont majoritairement contenues dans les fractions 8 à 19. (figures 10c et 10d). Dans les différentes fractions issues de plasma les protéines sont majoritairement contenues dans les fractions 6 à 20 (figure 10d). Dans les différentes fractions issues d'ISF humain ou murin les protéines sont majoritairement contenues dans les fractions 1 à 3 et 8 à 20 (figures 10a et 10b). La présence de protéines dans les fractions 1 à 3 suit la courbe de concentration en VE ; elle correspond donc probablement aux protéines vésiculaires.

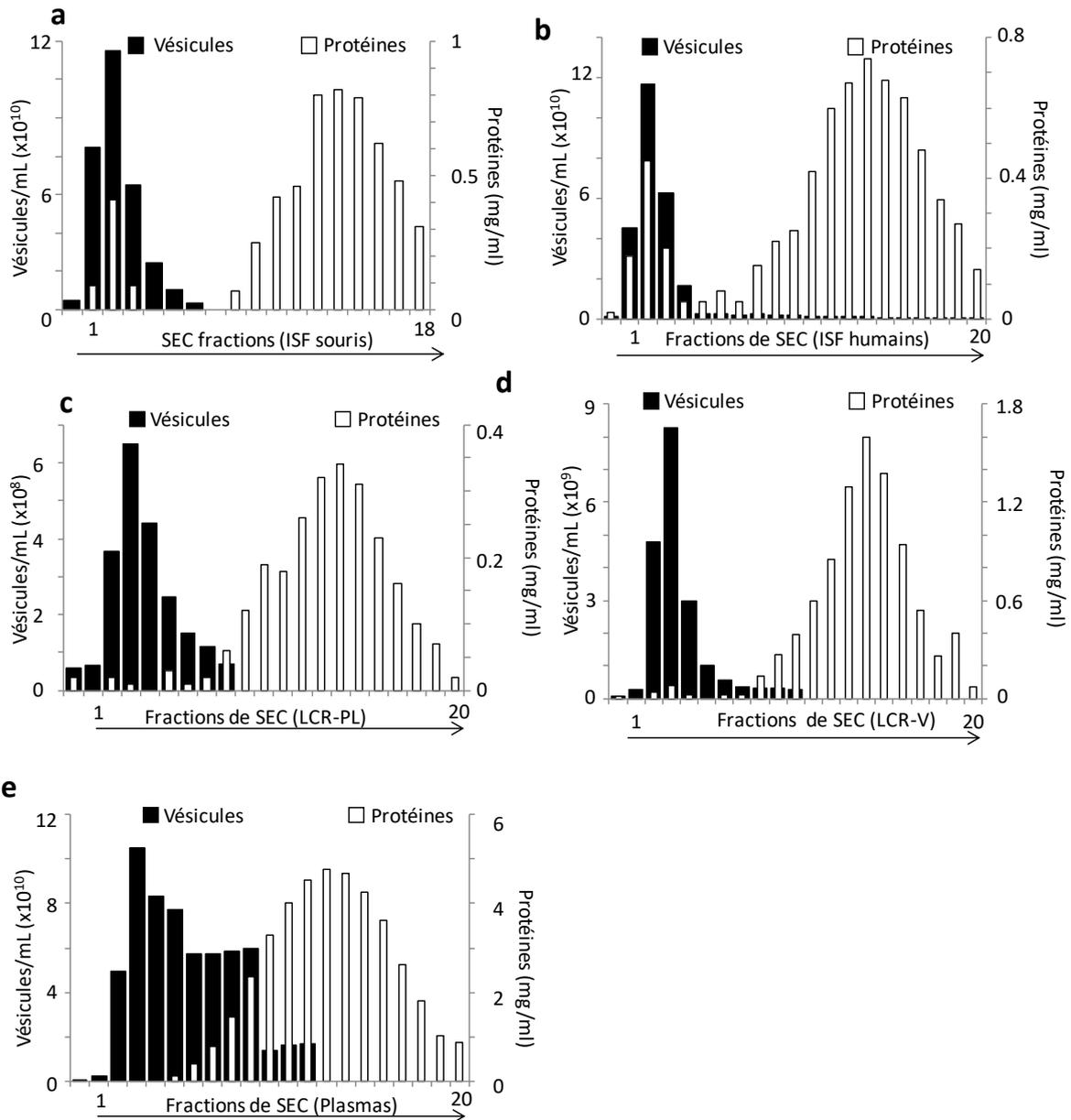


Figure 10 : Répartition des vésicules et des protéines en fonction de la fraction de SEC

Les différents fluides ont été fractionnés par SEC puis les différentes fractions analysées par NTA afin de quantifier les particules, et par nanodrop afin de doser les protéines. Concentration en VE (noir), concentration en protéines (blanc) des différentes fractions de SEC des fluides extracellulaires (a : ISF de cerveau de souris ; b : ISF de cerveau humain ; c : LCR-PL ; d : LCR-V ; e : plasma).

3. Analyse par colorations à l'argent des gels de protéines

Dans le plasma, le LCR et le liquide interstitiel cérébral, cette analyse, même après saturation du signal, a permis de mettre en évidence l'absence de macroprotéines dans les fractions 1 à 4, confirmant les données de Boing et *al.* (figures 11a à 11d)

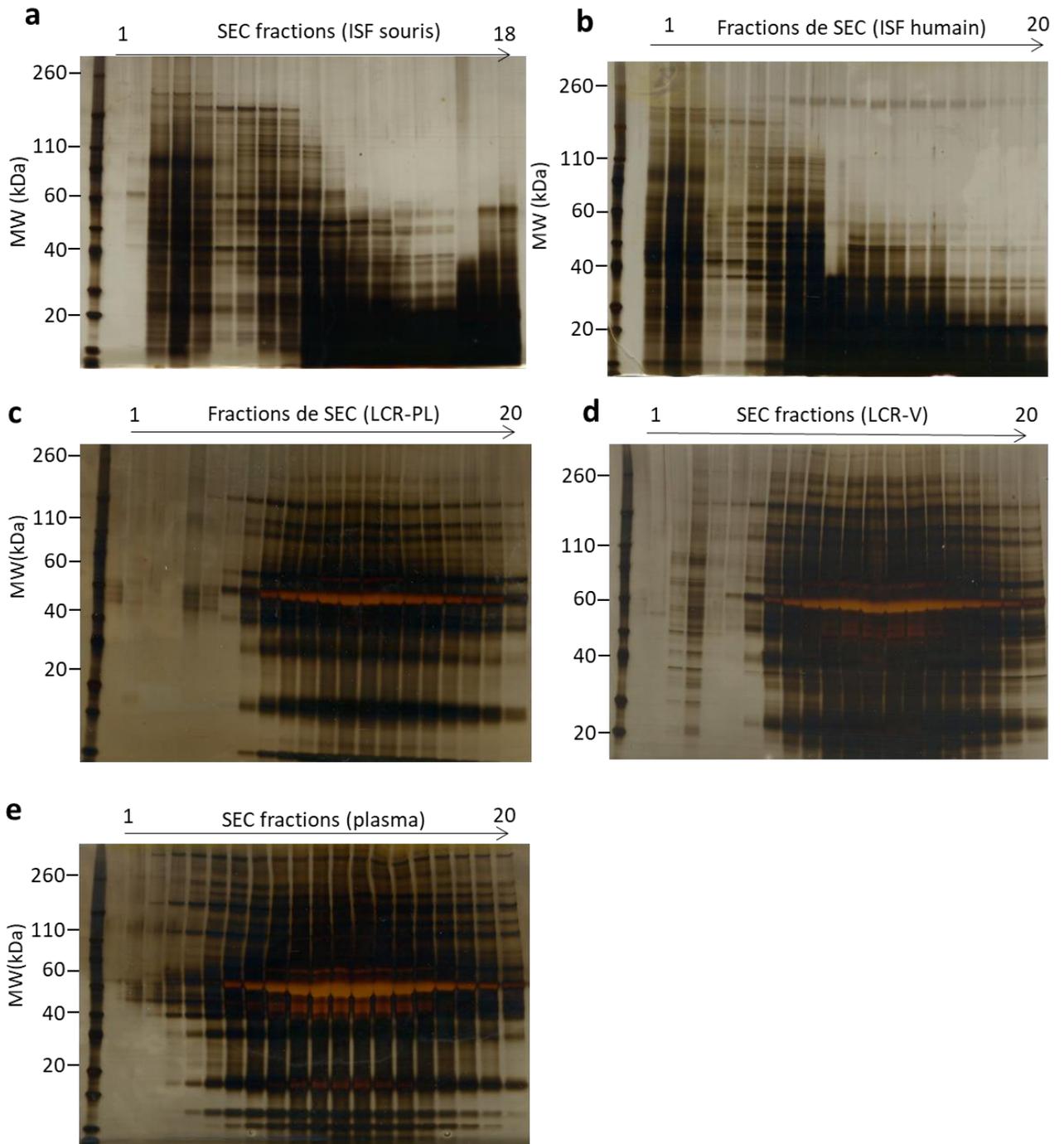


Figure 11 : Analyse par colorations à l'argent des gels de protéines

Gels de protéines colorés à l'argent des différentes fractions de SEC des fluides extracellulaires (a : ISF de cerveau de souris ; b : ISF de cerveau humain ; c : LCR-PL ; d : LCR-V ; e : plasma). Les différents fluides ont été fractionnés par SEC ,puis les différentes fractions et le témoin de taille déposés sur un gel NuPAGE, suivi d'un transfert sur membrane de nitrocellulose, avant révélation protéique à l'argent.

4. Analyse de la morphologie des VE en microscopie électronique

Sur les 3 types de liquide, l'analyse en microscopie électronique a permis de mettre en évidence la structure sphérique des VE (figure 12). Sur les VE issues de l'ISF humain nous avons mis en évidence, par technique immunogold, la présence de CD63, un marqueur d'exosomes (figure 12c)

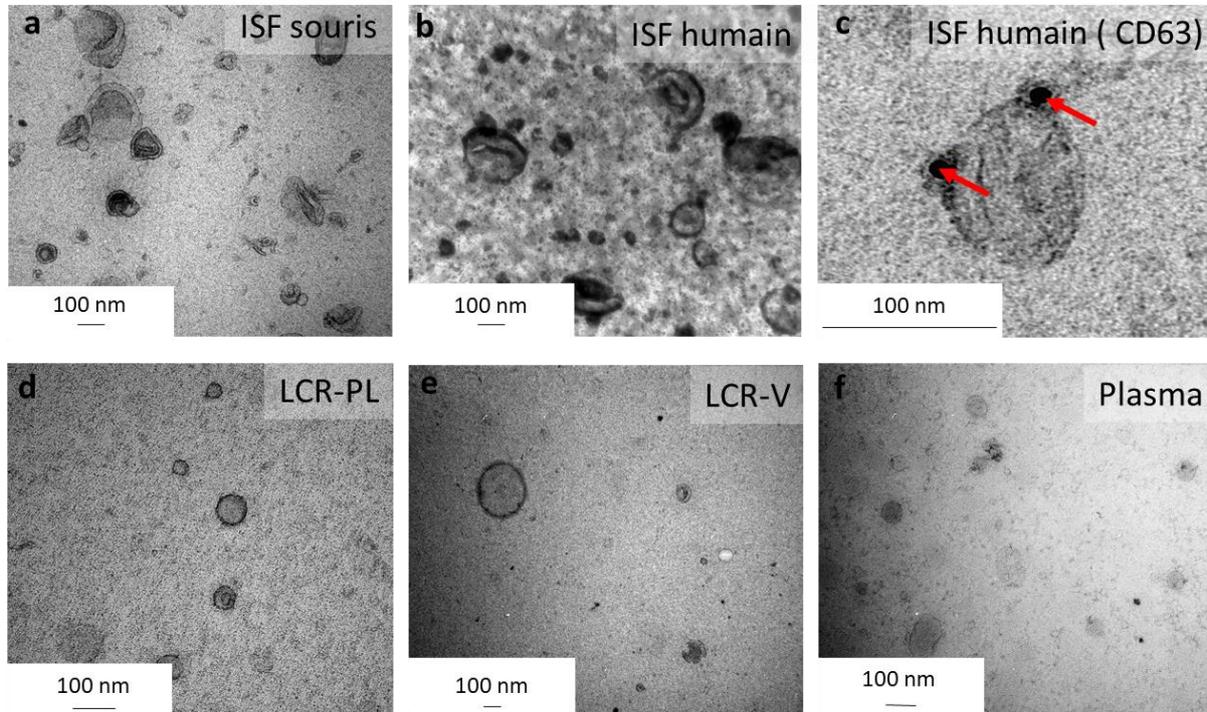


Figure 12 : Analyse par microscopie électronique à transmission des fractions de SEC.

Fractions de SEC 1-4 de différents fluides extracellulaires montrant des VE de 10 à 150nm et l'absence d'agrégats protéiques. Le marquage immunogold sur l'ISF humain montre la présence de CD63 sur des VE (flèches rouges) (c).

L'enrichissement de ces différents fluides extracellulaires murins et humains par SEC semblait donc une technique permettant une bonne séparation des VE des protéines libres extracellulaires, dont les macroprotéines. Néanmoins, elle ne permettait pas une séparation robuste des VE selon leur taille dans tous les fluides. Sur la base de ces données et pour les expériences suivantes, les fractions 1 à 4 (F1-4) ont été systématiquement regroupées et considérées comme la fraction enrichie en VE.

5. Analyse par Western-blot

Nous avons ensuite mis en évidence par Western blot la présence de la protéine de choc thermique 90 (HSP90) connue pour être associée aux VE (220) dans les fractions de SEC 1-4 extraites de l'ISF de souris Tg30Tau (figure 13). La quantité de protéine requise pour cette analyse ne nous a pas permis de faire cette recherche sur l'ensemble des fluides analysés.

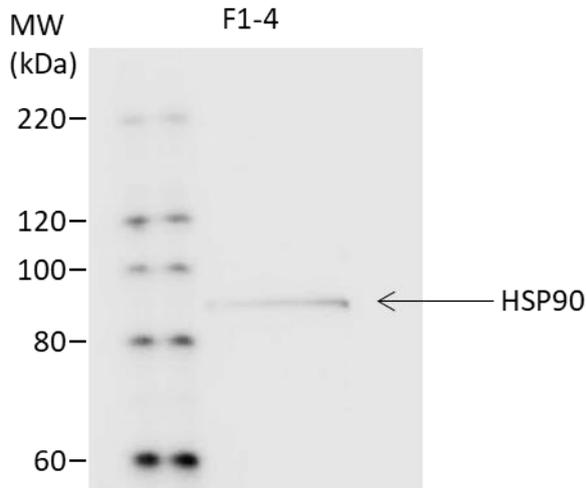


Figure 13 : Western-blot sur les fractions de SEC 1-4 de l'ISF de souris montrant la présence de protéine HSP90

B. Les VE extraites de l'ISF cérébral contiennent des espèces comportant des propriétés de recrutement.

Il a été montré que de la protéine Tau était contenue dans des VE du LCR (164). Le LCR étant en partie sécrété à partir de l'ISF, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les VE de l'ISF pourraient contenir des espèces de protéines Tau pathologiques et participer à leur propagation. De plus l'ISF étant directement en contact avec les neurones il nous paraissait vraisemblable qu'il contienne les VE sécrétées par les neurones.

1. Les VE extraites de l'ISF cérébral de souris Tg30tau ont la capacité de recruter Tau

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons validé notre approche expérimentale en étudiant l'ISF de souris transgéniques. Pour cela nous avons utilisé deux modèles murins de MA, l'un basé sur l'expression de Tau et le second sur l'expression d'APP : les souris Tg30Tau expriment la protéine Tau 1N4R humaine avec deux mutations pathogènes (P301S et G272V) sous le contrôle du promoteur Thy-1.2 spécifique aux neurones (217,218), et la souris la souris APP/PS1 surexprime l'A β 42 humaine. Les souris Tg30Tau développent des lésions Tau de type Alzheimer alors que les souris APP/PS1 développent des plaques d'A β (201–203). L'ISF a été extrait selon le protocole décrit par Polanco et collaborateurs par digestion douce des tissus (130).

Une première étape a été de vérifier la pureté de l'ISF. Pour cela nous avons vérifié en Western-blot l'absence de protéines cytoplasmiques (α -tubuline, figures 14a et b) et nucléaires (Histone H3, figure 14 c et d) dans l'ISF. Nous avons déposé 3 fois plus de protéines pour l'ISF que pour les lysats et même après saturation du signal nous n'avons pas détecté de protéine histone H3 ou d' α -tubuline (figure 14b et 14d). Ceci suggère la préservation de l'intégrité cellulaire lors de l'extraction de l'ISF et l'absence de contamination cellulaire dans l'ISF.

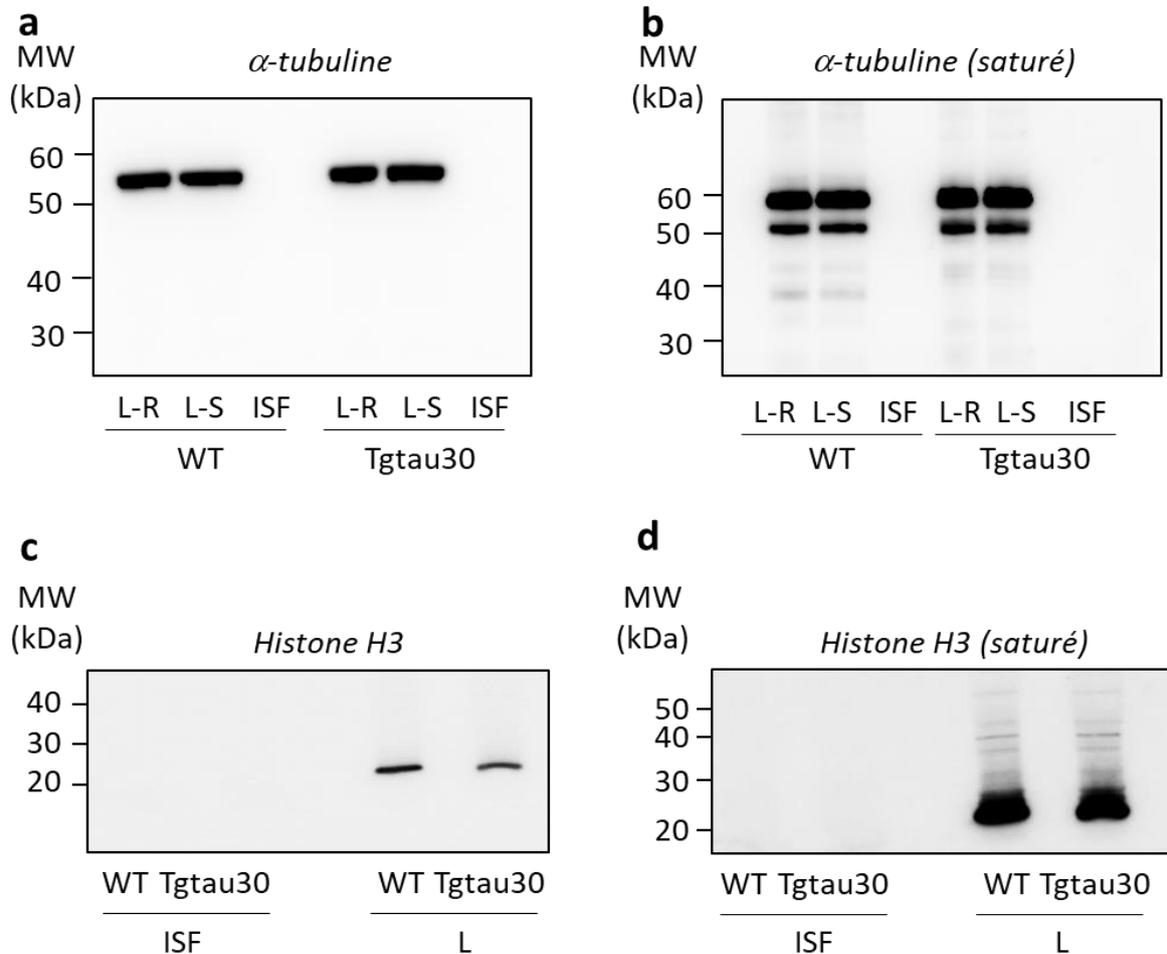


Figure 14 : Western-blot réalisés sur les ISF à la recherche de protéines cytoplasmique et nucléaire

Les extraits de cerveau de souris Tg30Tau et sauvages (WT) ont été récupérés soit dans du tampon RIPA (R) soit dans un tampon sucrose (S). L'ISF a été purifié à partir du cerveau entier cryopréserveré par dissociation mécanique douce puis digestion à la papaïne. Détection d' α -tubuline (protéine cytosolique, a, b) et Histone H3 (protéine nucléaire, c, d) sur les lysats de cerveau (L) ou sur l'ISF à partir de 10 ou 30 μ g de protéines respectivement. Absence de signal détecté même après saturation du signal (b, d) suggérant l'absence de contamination cellulaire dans l'ISF.

Nous avons ensuite voulu déterminer si les VE extraites de l'ISF contenaient de la Tau pathologique. Compte tenu de l'absence de signature biochimique spécifique du caractère pathologique de la protéine Tau, nous avons privilégié une analyse permettant de détecter le potentiel de recrutement de Tau. Nous avons choisi un modèle cellulaire déjà largement utilisé par la communauté scientifique et décrit comme sensible et spécifique. Ce modèle utilise des cellules HEK exprimant un fragment de Tau humaine mutée, couplé soit à la CFP, soit à la YFP (cellules TauRDP301SFRET). Si ces fragments sont recrutés dans la cellule par une même protéine, il se produit un transfert d'énergie détectable en cytométrie de flux (figure 7). Nous avons analysé sur ce système les fractions vésiculaires extraites à partir de l'ISF de cerveau de souris de phénotype sauvage, de Tg30Tau et de souris Tg APP/PS1 (témoins négatifs indemnes de lésions Tau contrairement à Tg30Tau). L'objectif de cette analyse était d'analyser le contenu des VE et non leurs propriétés d'adressage. Pour cette raison les VE étaient soniquées et l'entrée de leur contenu dans les cellules TauRDP301SFRET favorisée par un agent de transfection (lipofectamine). Après traitement, les cellules ont été laissées en

incubation pendant 72h, afin de favoriser le recrutement. Après 72h, nous avons analysé les cellules par cytométrie de flux, ce qui a permis une quantification du signal sur un grand nombre de cellules (>10000). Les contrôles positifs et négatifs sont obtenus en traitant les cellules TauRDP301SFRET par des fibres recombinantes ou du PBS.

Un signal FRET croissant avec l'âge est apparu pour les VE extraites de souris Tg30Tau. Aucun signal FRET n'a par contre été détecté pour les VE extraites à partir des souris de phénotype sauvage ou APP/PS1 (figure 15a). Ces données ont permis de suggérer le concept selon lequel des espèces de protéines Tau comportant des capacités de recrutement sont présentes dans les VE.

Afin de vérifier que le signal FRET est induit par la protéine Tau, nous avons immunodéplété la fraction vésiculaire issue de l'ISF de souris Tg30Tau à l'aide d'anticorps anti-tau HT7 ou d'un anticorps contrôle isotypique. L'immunodéplétion avec l'anticorps HT7 induisait une diminution de la concentration de Tau totale (dosage par ELISA) (figure 15e) et du signal FRET par rapport à l'immunodéplétion avec un anticorps de même isotype (figure 15b). La diminution du signal FRET par immunodéplétion est corrélée à la diminution de concentration de Tau (coefficient de corrélation de Spearman = 0,758 ; p = 0,002).

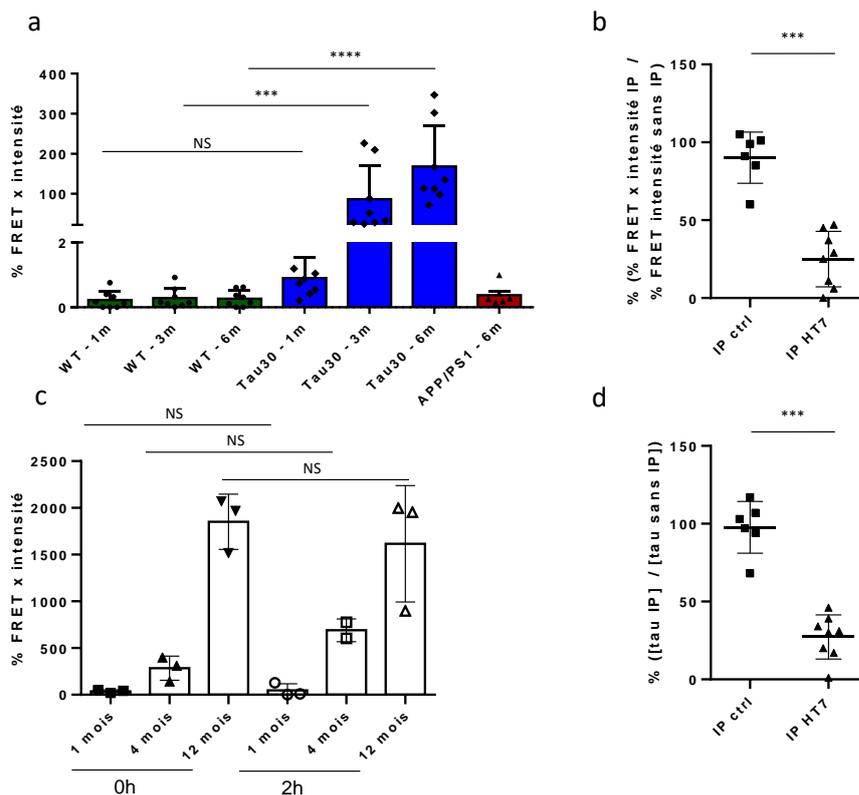


Figure 15 : Les VE de l'ISF de souris Tg30Tau contiennent de la Tau ayant des propriétés de recrutement.

Les fractions 1-4 de SEC, contenant la majorité des VE, extraites à partir de l'ISF de cerveau de souris Tg30tau induisent un signal FRET croissant avec l'âge (a). Les souris APP/PS1 et sauvages (WT) n'induisent pas de signal FRET (a). Le signal FRET induit par les VE de l'ISF de cerveaux de souris Tg30Tau est réduit par l'immunodéplétion par un anticorps anti-tau (HT7) par rapport à une immunodéplétion par un anticorps du même isotype (b). Cette diminution du signal FRET est corrélée à la diminution de concentration de Tau (d). Le signal FRET est donc au moins en partie induit par une espèce de Tau reconnue par l'Ac HT7. Le signal FRET induit par les fractions de SEC 1-4 extraites à partir de l'ISF de cerveau de souris Tg30Tau de 1 mois, 4 mois et 12 mois n'est pas modifié, que la congélation du cerveau se fasse immédiatement ou 2h après le sacrifice (c). Test statistique de Kruskal-Wallis avec correction du risque α (a - d).

2. Les capacités de recrutement de VE extraites de l'ISF cérébral de patients dépendent de la Tauopathie dont ils sont atteints

En vue de valider sur des cerveaux de patients atteints de Tauopathies, les données obtenues sur l'animal, nous avons reconduit les mêmes expériences mais à partir de VES issus de tissus cérébraux humains.

Dans cette partie nous avons voulu déterminer :

1) Si les VE extraites de cerveaux de patients atteints de Tauopathie contenaient des espèces de protéines Tau ayant un potentiel de recrutement et

2) Si ce potentiel de recrutement était identique pour la MA, la PSP et la PiD.

Pour cela nous avons extrait l'ISF de cerveaux conservés dans la Biobanque de Lille. Il s'agissait de cerveaux témoins ne présentant pas de maladie neurodégénérative (n = 5), AD (stade de Braak VI) (n = 10), PSP (n = 5), PiD (n = 5). Chaque fragment cérébral a été divisé en deux : une partie (miroir) a été fixée par le formol et incluse en paraffine, la seconde partie a permis l'extraction d'ISF selon les procédures décrites chez la souris pour l'analyse en FRET (figure 16a). L'ISF a été extrait à partir de 3 régions cérébrales sur chaque cerveau : préfrontal associatif, occipital (visuel secondaire) et cervelet intermédiaire (cortex et noyau dentelé). Nous avons choisi ces régions cérébrales car elles sont connues pour être atteintes de manière différentielle dans les différentes pathologies étudiées (figure 16b et c). Les données démographiques sont présentées dans le tableau IV (annexes).

Les capacités de recrutement du contenu des VE sont ensuite été évaluées sur le système de FRET. Les VE extraites de l'ISF de tissu cérébral préfrontal et occipital de patients MA induisent un signal FRET significatif par rapport aux VE dérivées de patients témoins (figure 16d). Par contre il n'y a pas de différence significative sur le signal FRET entre les VE extraites de patients Pick, PSP et témoin quelle que soit la région cérébrale analysée (figure 16d).

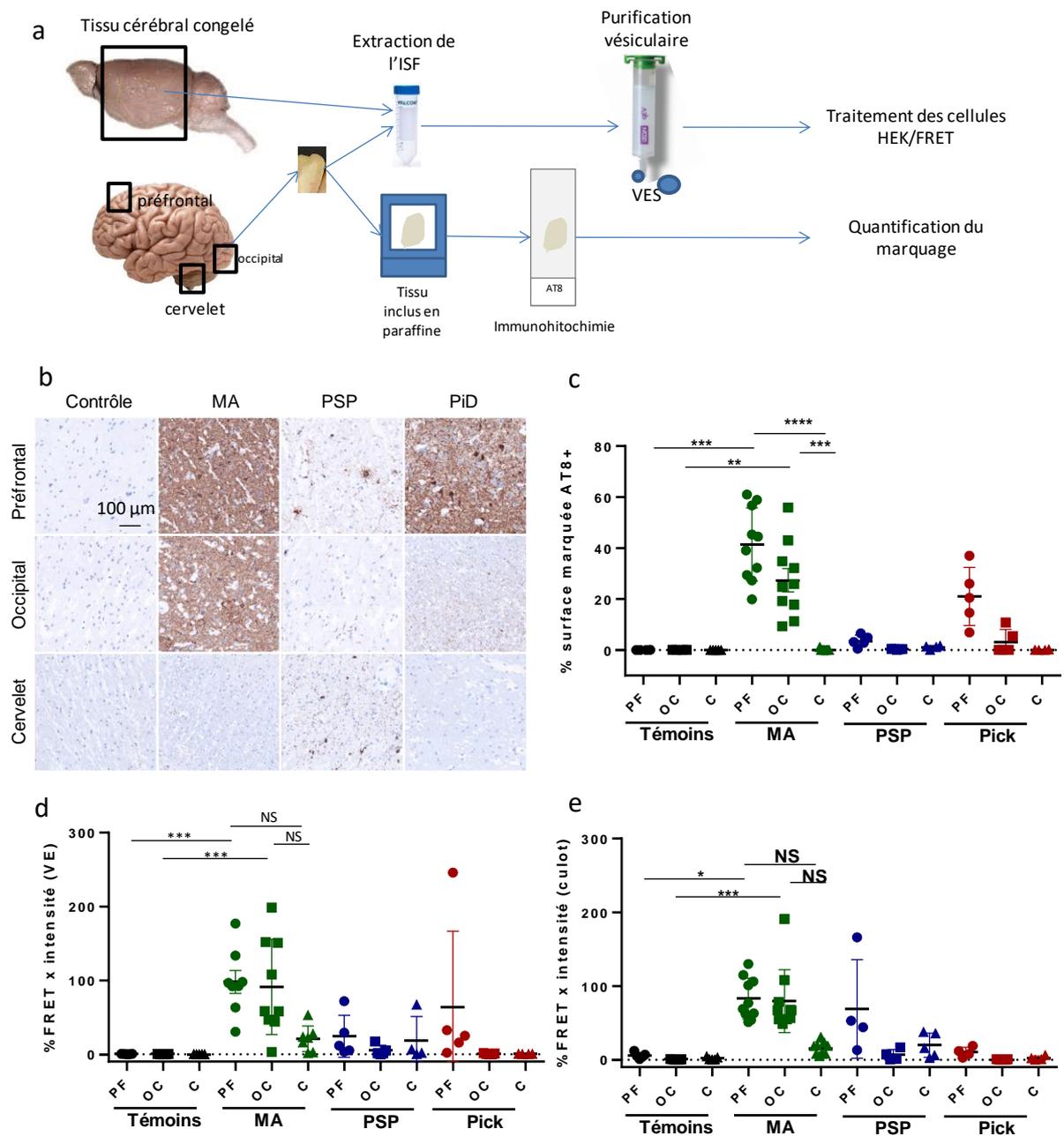


Figure 16 : détection par FRET de la capacité de recrutement des VE extraites d'ISF d'encéphale humain

(a) le tissu cérébral humain congelé des aires préfrontale, occipitale et du cervelet ont été divisées en 2 parties. Une partie a été fixée par le formol et incluse en paraffine afin de réaliser un immunomarquage AT8 (b) et la surface du marquage a été quantifié (c). La seconde partie a permis l'extraction de l'ISF. Les VE ont été extraites par SEC à partir de l'ISF de tissu cérébral. Le potentiel de recrutement des VES (d) et du culot tissulaire (e) a été déterminé en traitant les cellules TauRDP301SFRET. Le signal FRET a été quantifié par cytométrie de flux. Test statistique de Kruskal-Wallis avec correction du risque α (c-d).

Nous avons ensuite évalué si le signal FRET des VE extraites de l'ISF était corrélé au signal FRET induit par les culots tissulaires des mêmes fragments cérébraux, ou au marquage immunohistochimique effectué sur les tissus miroirs. Pour cette analyse, les effectifs ne permettaient pas de faire une analyse de corrélation région par région. Nous avons donc groupé les différentes régions pour chaque groupe (MA, PSP, Pick et témoins). Nous avons ainsi pu montrer une corrélation entre le signal FRET induit par les VE et le marquage AT8

(tableau 6, rouge), et entre le signal FRET induit par les VE et celui induit par les culots (tableau 5, vert).

Tableau 6 : Coefficient de corrélation de Spearman entre signal FRET induit par les VE, signal FRET induit par les culots cellulaires et surface IHC AT8 en fonction de la pathologie (MA, PSP, PiD)

	Sperman corrélation r^2	p
MA VE vs Culot	0,747	<0.001
MA VE vs IHC	0,680	<0.001
MA Culot vs IHC	0,293	<0.001
PSP VE vs Culot	0,781	0,006
PSP VE vs IHC	0,692	0,021
PSP Culot vs IHC	0,588	0,047
PiD VE vs Culot	0,802	0,001
PiD VE vs IHC	0,906	<0.001
PiD Culot vs IHC	0,616	0,027

Néanmoins en s'intéressant aux zones de l'encéphale pour lesquelles les VE extraites de l'ISF n'induisent pas de signal FRET de manière statistiquement significative, il semble que le signal FRET induit par les VE et les culots soit présent dans certaines régions en l'absence de marquage immunohistochimique. C'est le cas pour le cervelet dans la MA (figure 17a et 17e) ou la région occipitale dans la PSP (figure 17b et 17f).

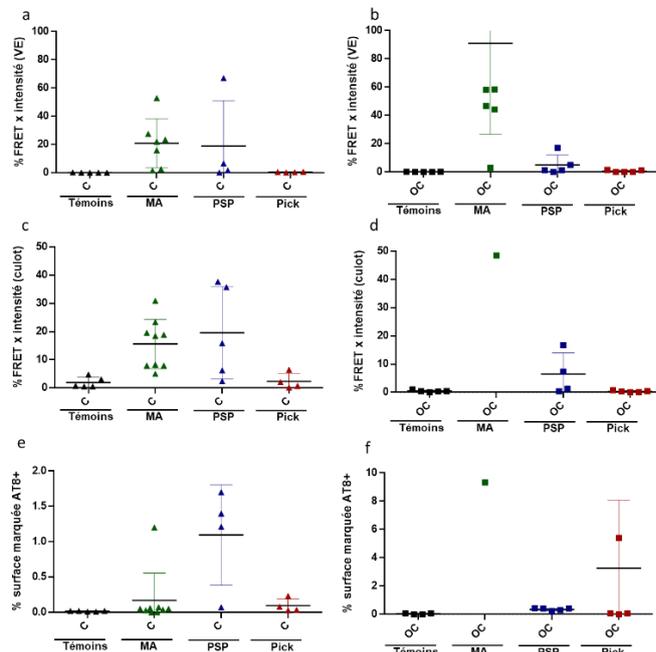


Figure 17 : Détection par FRET de la capacité de recrutement des VE extraites d'ISF d'encéphale humain en se focalisant sur les valeurs faibles ne comportant pas de différence statistiquement significatives par rapport aux témoins. Le tissu cérébral humain congelé de l'aire occipitale et du cervelet ont été divisées en 2 parties. Une partie a été fixée par le formol et incluse en paraffine afin de réaliser un immunomarquage AT8 et la surface du marquage a été quantifié (e et f). La seconde partie a permis l'extraction de l'ISF. Les VE ont été extraites par SEC à partir de l'ISF de tissu cérébral. Le potentiel de recrutement des VES (a et b) et du culot tissulaire (c et d) a été déterminé en traitant les cellules TauRDP301SFRET. Le signal FRET a été quantifié par cytométrie de flux.

3. Les capacités de recrutement de VE extraites de l'ISF cérébral ne dépendent pas du délai *post mortem*

Les cerveaux autopsiques humains ont un délai post-mortem (DPM) avant congélation, variable d'un patient à l'autre. Afin de déterminer si le DPM influence le signal FRET, nous avons extrait les VE à partir d'ISF de cerveaux de souris dont le délai post-sacrifice avant congélation (tissu cérébral laissé à température ambiante) était de 0h ou de 2h. Ces différentes fractions enrichies en VE ont ensuite été étudiées sur le système de FRET. Il n'y avait pas de différence de signal FRET entre congélation immédiate et congélation après un délai de 2h (figure 15d).

C. Les VE extraites de l'ISF de cerveaux de patients atteints de MA induisent de la pathologie in-vivo

Afin d'étudier le potentiel de recrutement/nucléation des VE extraites de l'ISF de patients atteints de MA nous avons utilisé un modèle murin déjà utilisé dans le laboratoire. Ce modèle est basé sur l'injection intracérébrale stéréotaxique, dans le cerveau de souris Tg30Tau âgées d'un mois, de matériel dérivé du cerveau de patients atteints de MA (225). Ces souris transgéniques exprimant dans les neurones une protéine Tau humaine mutée, développent progressivement des lésions proches de celles observées dans la MA. Ces lésions sont très faibles à 1 mois (225), permettant ainsi d'évaluer l'effet de l'inoculat sur la potentialisation de la pathologie endogène.

Les VE extraites à partir de l'ISF ont été concentrées et injectées dans la corne d'Amon (CA1) de souris transgéniques ou de phénotypes sauvages. Un mois post-injection, la pathologie Tau était détectée par immunohistochimie en utilisant un anticorps conformationnel (MC1). Celui-ci reconnaît des épitopes apparaissant au cours de la pathologie du fait de modifications structurales de la protéine Tau (215,216). Six coupes cérébrales couvrant tout l'hippocampe ont été sélectionnées pour la quantification du signal.

Cette analyse montre que les VE extraites d'ISF de cerveaux de patients MA est capable de potentialiser l'apparition de lésions Tau dans les neurones pyramidaux de la corne d'Amon par rapport au groupe injecté avec du PBS. De plus, aucun signal n'a été détecté chez les souris de phénotype sauvage, confirmant que les VE extraites d'ISF de cerveaux de patients MA contiennent des espèces comportant des propriétés de recrutement (Figure 18).

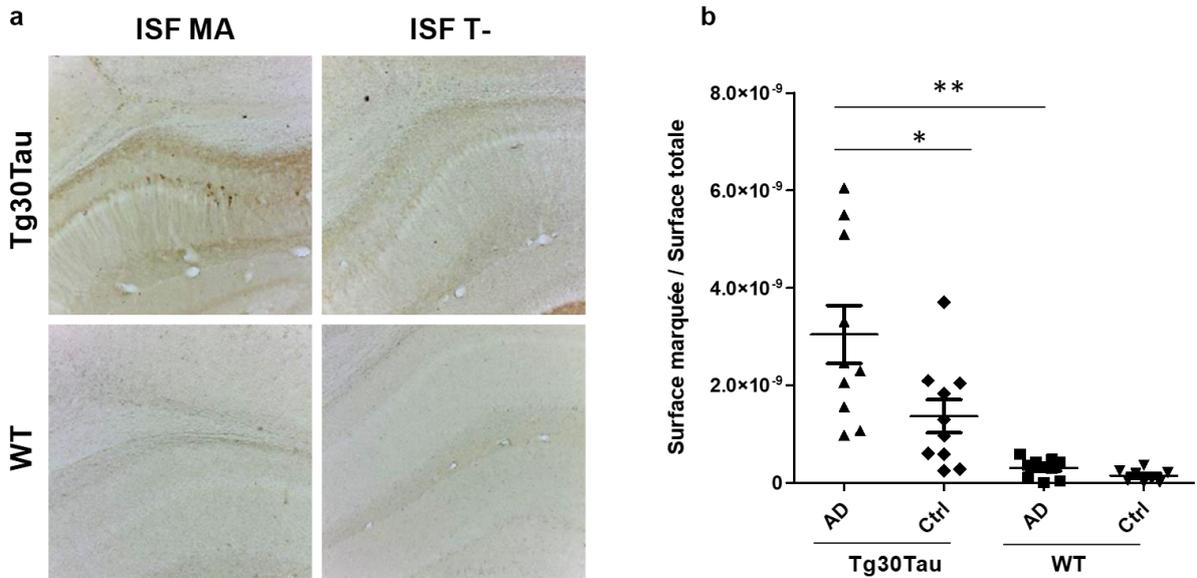


Figure 18 : Quantification des dépôts de tau induits par injection stéréotaxique de VE extraites d'ISF de cerveaux de patients MA

Les fractions de SEC 1-4 correspondant aux VE extraites d'ISF de cerveaux de patients MA et de patients contrôles ont été injectées dans l'hippocampe de souris tg30Tau ou sauvages (WT) de 1 mois. Après 1 mois les souris ont été sacrifiées et les dépôts de tau dans l'hippocampe marqués par immunohistochimie avec l'anticorps primaire MC1 dirigé contre de la Tau ayant des changements conformationnels (a). Le marquage obtenu a été quantifié (b). Les VE extraites de cerveaux de patients MA induisent des lésions de type DNF dans le gyrus denté. Test statistique de Kruskal-Wallis avec correction du risque α (b).

D. VE de LCR et de plasma humains et potentiel de recrutement

De manière physiologique, l'ISF cérébral et le LCR ont des échanges permanents notamment à travers la barrière hémato-méningée (BHM), si bien que le LCR est souvent considéré comme le miroir de l'ISF.

De plus, des formes phosphorylées et non phosphorylées de la protéine Tau ont également été détectées dans les VE extraites du LCR de patients atteints de MA et sains (118,226). Nous avons donc voulu déterminer si les VE extraites de LCR de patients atteints de MA avaient des capacités de recrutement. Pour cela nous avons utilisé des LCR congelés de la neurobank, prélevés par ponction lombaire (LCR-PL), chez des patients atteints de MA et des témoins (données démographiques présentées dans les tableaux I en annexes). Comme cela a été fait pour l'ISF, des VE ont été extraites sur colonnes SEC avant d'être analysées par le test de FRET. Les résultats nous ont montré qu'il n'y avait pas de différence de signal de FRET dans les VE du LCR lombaire des patients atteints de MA et les témoins (figure 19a).

Néanmoins, le LCR lombaire et le LCR ventriculaire ont une composition différente. En effet les protéines d'origine neuronale (telle que Tau) ont une concentration décroissante des ventricules à la région lombaire (227). Sur la base de ces données, nous avons inclus dans notre étude des LCR-PL et des LCR-V prélevés en post-mortem chez des patients atteints de différentes Tauopathies.

Comme précédemment, des VE ont été extraites sur colonnes SEC à partir de LCR-V et de LCR-PL collectés auprès de la Biobanque de Lille (données démographiques présentées en annexes) avant d'être analysées par le test de FRET.

Les résultats montrent un signal FRET significatif induit par les VE extraites de LCR-V en comparaison des VE extraites de LCR-PL (figure 19b). Néanmoins pour des raisons de disponibilité, aucun LCR-V témoin n'a pu être analysé, ce qui limite l'interprétation de ce résultat.

Le fait qu'il existe un gradient décroissant de protéines Tau ayant un potentiel de recrutement du LCR-V au LCR-PL sous-tend que des espèces de protéines Tau pathologiques sont réabsorbées au cours de leur circulation des ventricules à l'espace sous arachnoïdien lombaire. Cela indique qu'il pourrait exister un passage de ces espèces du LCR vers le sang. De fait, le développement de techniques de détection ultrasensibles comme l'IMR (228), l'ELISA (229–231) ou le SIMOA (232) ont récemment permis la détection de protéines Tau dans le plasma. Des formes phosphorylées et non phosphorylées ont également été détectées dans les VE dérivées du plasma (167,169,170,233,234) de patients atteints de MA et de sujets sains suggérant la présence de Tau ayant des capacités de recrutement dans les VE.

Nous avons donc testé cette hypothèse, à partir de plasmas, avec la méthode de détection basée sur le FRET. Les plasmas de patients non MA (n = 13, tableau III) et MA (n = 28, tableau III), ont été collectés auprès de la Biobanque de Lille. Les VE ont été extraites sur colonnes de SEC avant d'être analysées par le test de FRET. Aucune différence significative n'a été notée entre les groupes, suggérant, soit que les espèces toxiques de Tau passent peu ou pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la BHM, soit qu'elles sont rapidement éliminées par voie périphérique (figure 19c).

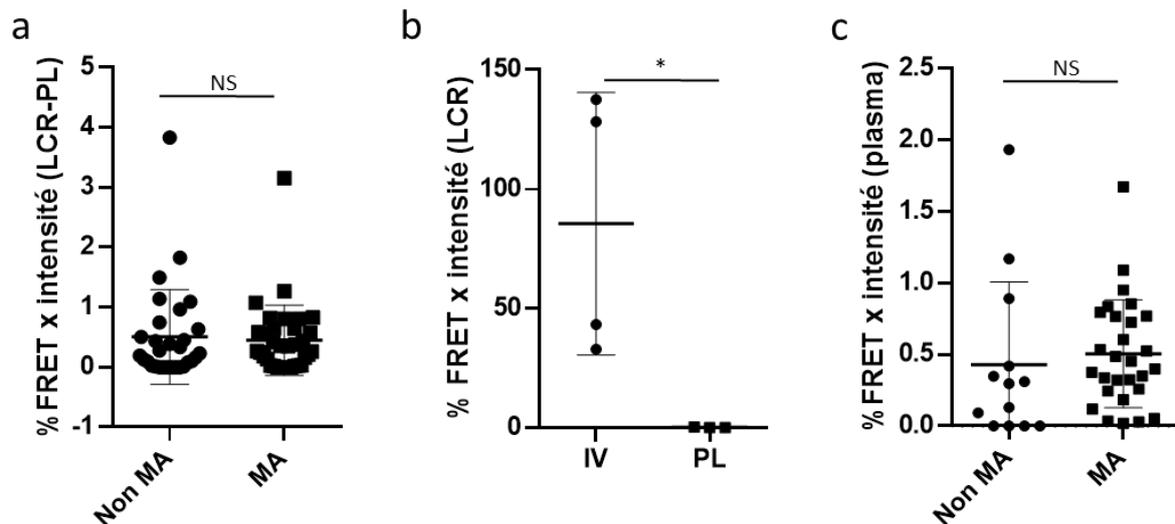


Figure 19 : Capacités de recrutement des VE extraites de plasma et de LCR

Les capacités de recrutement induites par les VE ont été mesurées par FRET sur Les VE ont été extraites à partir de LCR et de plasma. **a** : les VE extraites de LCR-PL prélevé chez des patients vivants atteints de MA (n=34) n'induisent pas de signal FRET par rapport aux patients non MA (n=30). **b** : le VE extraites de LCR-V post-mortem de patients atteints de tauopathie (n=4) induit un signal FRET significatif par rapport au LCR-PL post mortem de patients atteints de tauopathie (n=3). **c** : les VE extraites de plasmas de patients atteints de MA (n= 28) n'induisent pas de signal FRET par rapport aux non MA (n=13). Test statistique t-test pour a et c et Man-Whitney pour b.

Dans la première partie de ce travail nous avons démontré :

1/ la présence de protéine Tau ayant des propriétés de recrutement dans les VE extraites du liquide interstitiel cérébral de patients atteints de MA.

2/ l'absence (ou la moindre abondance) de ces espèces dans les VE de l'ISF de patients atteints de PSP ou de PiD.

3/ la capacité d'induction, par les VE de l'ISF de patients atteints de MA, de pathologie intraneuronale dans l'hippocampe de cerveaux de souris transgéniques exprimant une Tau humaine mutée.

II. Variation de la sécrétion de VE dans le LCR et le plasma au cours de la MA

La présence de protéine Tau pathologique dans les VE de l'ISF cérébral de patients atteints de MA, laisse penser que les VE ont un rôle important dans l'évolution de cette maladie. Néanmoins les VE analysées sont issues de cerveaux de patients atteints de MA à un stade très avancé.

Néanmoins, nous pensons que les modes de propagation de Tau pourraient être différents selon le stade évolutif, et que les VE, mécanisme actif de sécrétion de Tau, pourrait être majoritairement impliquées aux stades précoces avant que survienne une mort neuronale massive. Nous pensons également que la sécrétion de VE pourrait être un mécanisme de défense, en réaction à la présence de Tau pathologique.

Dans l'optique de quantifier les différentes espèces de Tau sécrétées dans les VE aux différents stades évolutifs de la MA, nous avons constitué une cohorte prospective constituée de patients atteints de MA à tous les stades évolutifs.

En raison de problèmes de recrutement, nous avons pour cette cohorte uniquement des résultats préliminaires. En effet nous attendons d'avoir terminé le recrutement avant de débiter les analyses biochimiques sur ce matériel précieux afin de s'affranchir des variations liées aux lots de consommables utilisés. De plus nous espérons pouvoir déterminer les espèces pathologiques de Tau dans les VE de l'ISF cérébral afin de pouvoir mieux cibler nos analyses sur les VE de LCR et de plasma.

Sur les patients inclus, les VE ont été quantifiées par NTA. Les analyses statistiques ne permettent pas de montrer de différence significative sur la concentration de VE de taille supérieure à 150 nm (correspondant majoritairement aux ectosomes) et sur les VE dont la taille est comprise entre 10 et 150 nm (correspondant majoritairement aux exosomes), que ce soit sur les plasmas ou sur le LCR (figure 20).

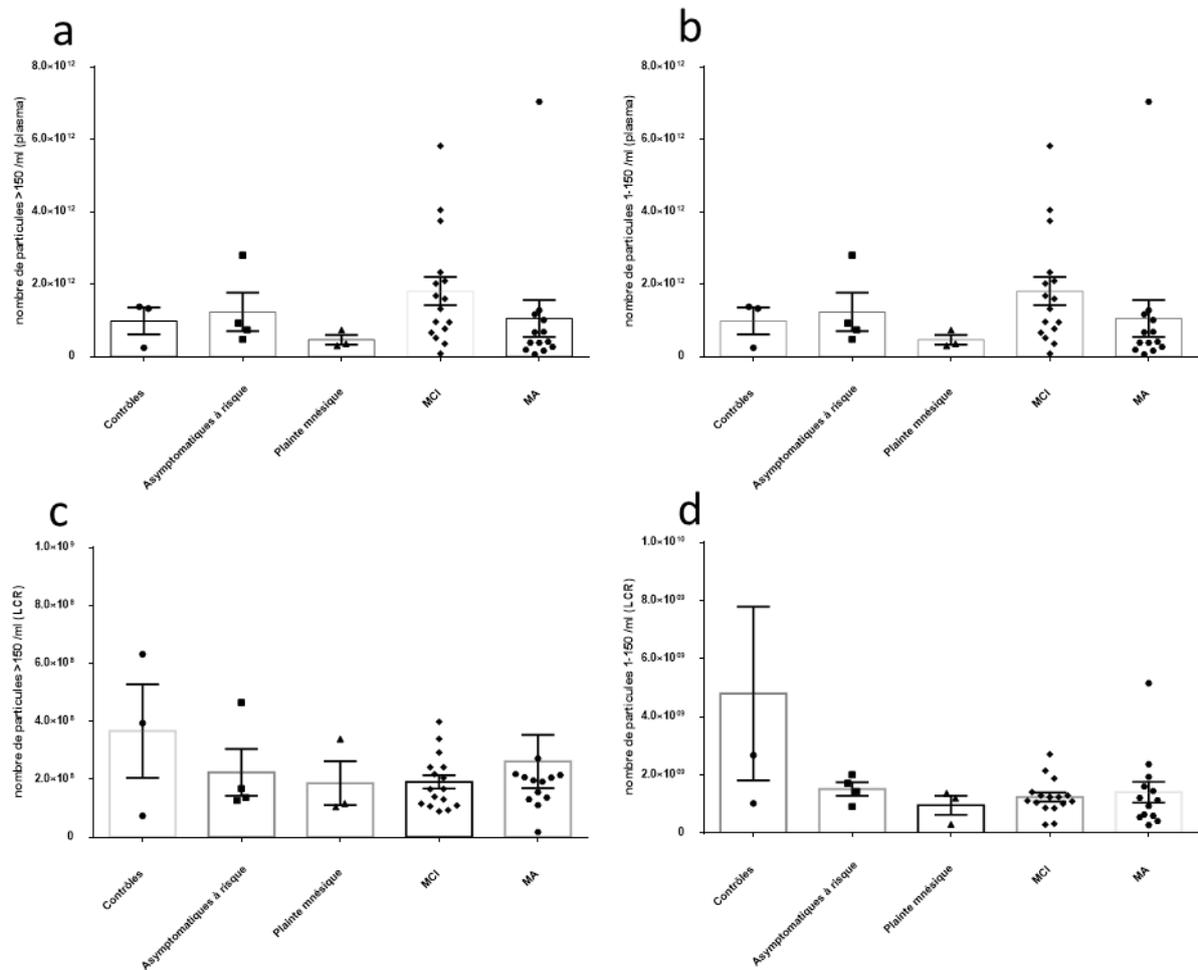


Figure 20 : Quantification du nombre de particules dans le plasma et le LCR de patients de la cohorte prospective ecTAUsome. Le fractionnement vésiculaire par SEC a été effectué immédiatement après le prélèvement. Les particules ont été quantifiées sur la fraction vésiculaire (1-4) par NTA. Il n’y a pas de différence sur le nombre de vésicules entre les différents groupes aussi bien sur le plasma que sur le LCR. Contrôles : n=3 ; Asymptomatiques à risque : n=4 ; plainte mnésique : n=3 ; MCI : n=17 ; MA : n=13 Test statistique de Kruskal-Wallis avec correction du risque α (a - d).

III. Existe-t-il un transfert de Tau de neurones à astrocytes ?

A. Transfert de Tau de neurones à astrocytes : étude en chambres microfluidiques

Nous avons démontré dans la partie précédente que les VE extraites de cerveaux de patients atteints de Tauopathie, contiennent des espèces de protéines pathologiques capables d'induire de la pathologie neuronale dans l'hippocampe de souris. Cela évoque une participation des VE dans la propagation de la pathologie Tau. La majorité des études *in vitro* sur la propagation de type prion se sont focalisées sur le transfert de neurones à neurones. Pourtant, alors que les astrocytes n'expriment pas physiologiquement la protéine Tau, il existe dans l'ensemble des Tauopathies, des agrégats de Tau dans les cellules gliales et en particulier dans les astrocytes. Nous avons ainsi fait l'hypothèse que la présence de la protéine Tau dans les astrocytes est d'origine neuronale et qu'il existerait donc un transfert de celle-ci de neurones à astrocytes. Nous pensons également que le transfert de Tau de neurone à astrocyte pourrait être différent entre les Tauopathies 3R et 4R du fait de la différence d'abondance des lésions gliales dans les Tauopathies 4R (multiples lésions astrocytaires dans la PSP et la CBD) et 3R (faible abondance des lésions astrocytaires dans la PiD) et de la différence de propagation de ces deux isoformes (119).

Afin de démontrer ce transfert, nous avons utilisé un système de culture en chambre microfluidique permettant la mise en contact d'axones de cultures primaires de neurones et d'astrocytes de rats. Ce système de chambre microfluidique permet, grâce à un différentiel de pression, d'isoler deux compartiments (somato-dendritique et axonal). Grâce à l'utilisation de vecteurs lentiviraux, les neurones expriment des protéines Tau humaines 1N4R-V5 ou Tau1N3R-V5 contenant une étiquette V5. La direction du flux du compartiment axonal vers le compartiment somato-dendritique garantit l'absence de contact des astrocytes avec les vecteurs lentiviraux comme précédemment démontré dans notre laboratoire (117). Grâce à un marquage immunohistochimique utilisant un anticorps primaire anti-V5, nous avons mis en évidence, après 6 jours d'infection, la présence de protéine Tau 1N4R-V5 ou 1N3R-V5 dans les astrocytes, démontrant ainsi le transfert de cette protéine de neurones à astrocytes (figure 21). Ce marquage est tantôt diffus, tantôt punctiforme dans le cytoplasme de l'astrocyte, quelque soit l'isoforme de Tau.

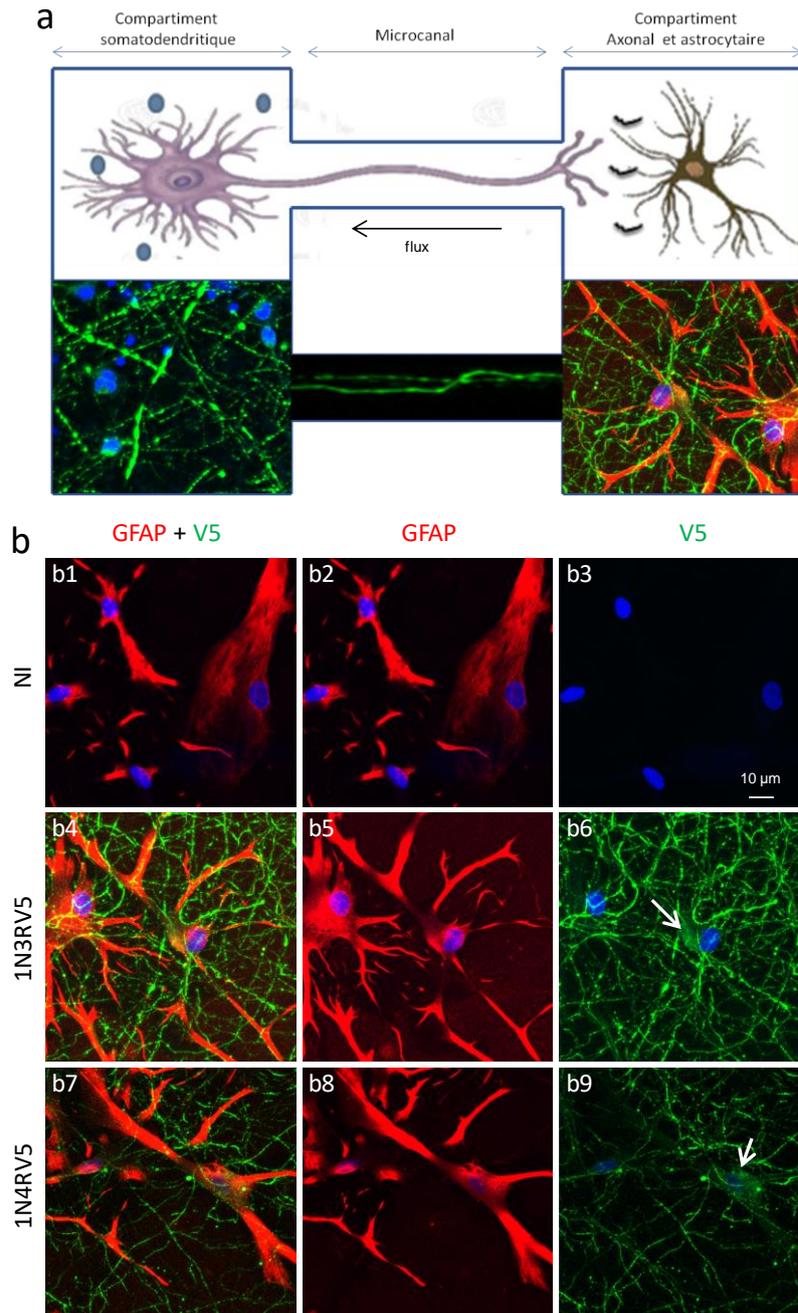


Figure 21 : Coculture neurones/astrocytes en chambres microfluidiques

a : les neurones primaires sont cultivés dans le compartiment somatodendritique. Les astrocytes sont cultivés dans le compartiment axonal dans lequel ils sont en contact avec les axones de neurones. Les deux compartiments sont reliés par des microcanaux. Les neurones expriment une protéine Tau humaine étiquetée V5 (1N4RV5 ou 1N3RV5) grâce à une infection lentivirale. Le flux du compartiment axonal au compartiment somato-dendritique garantit l'absence de contact des astrocytes avec les vecteurs lentiviraux. Sept jours après l'infection lentivirale, les cultures sont fixées et la présence de protéine Tau étiquetée V5 est mise en évidence par immunocytofluorescence avec l'anticorps anti-V5. Les astrocytes sont marqués par la GFAP. Les différents compartiments sont analysés par microscopie confocale. b : compartiment axonal d'une chambre microfluidique dont les neurones n'ont pas été infectés (b1 à b3), exprimant l'isoforme 1N3RV5 (b4 à b6) et l'isoforme 1N4RV5 (b7 à b9). Dans le compartiment axonal des chambres microfluidiques dont les neurones expriment l'une des deux isoformes de Tau on observe un marquage intense des axones et un marquage cytoplasmique diffus du cytoplasme des astrocytes (flèches) avec quelques renforcements punctiformes, démontrant le transfert de Tau de neurones à astrocytes (b6 et b9). Il n'y a pas de signal dans les chambres dont les neurones n'ont pas été infectés (b3).

B. Voies de transfert de la protéine Tau de neurones à astrocytes

Ce modèle de coculture en chambres microfluidiques permet un contact direct axone – astrocyte mais également entre l'astrocyte et les différents éléments sécrétés dans le compartiment astrocytaire par les axones et les astrocytes (soit sous forme libre soit sous forme de VE). Il est donc difficile d'explorer spécifiquement une voie de transfert. Les VE sont connues pour être un moyen de transfert de protéines entre les neurones et les astrocytes (235). De plus, si le transfert de Tau se fait par la synapse, l'astrocyte pourrait prendre part à ce mécanisme comme c'est le cas pour les neurotransmetteurs. Pour ces raisons, nous nous sommes focalisés sur les espèces sécrétées, soit sous forme de VE, soit sous forme libre.

Nous avons traité des cultures primaires d'astrocytes murins avec des fractions enrichies en VE de 10 à 150nm (connues pour être principalement des exosomes) ou VE >150nm, (connues pour correspondre principalement à des ectosomes) issues de milieu de culture conditionné par des cultures primaires de neurones de rats surexprimant, par infection lentivirale, la protéine Tau 1N4R-V5 ou 1N3R-V5 (figure 22a). Le critère de taille pour différencier les exosomes des ectosomes n'est pas absolu puisque les VE de 100 à 150nm correspondent à un mélange d'exosomes et d'ectosomes. Pour cette raison, et conformément aux recommandations de la MISEV(220), nous appellerons les vésicules de 10 à 150nm petites VE et les VE >150nm grandes VE.

Ici nous avons utilisé une méthode d'enrichissement en VE par ultracentrifugation car le rendement de cette méthode est supérieur à celui de la SEC et qu'il n'y a pas de risque de co-précipitation d'agrégats de Tau avec les VE puisque la surexpression de Tau est induite par un vecteur lentiviral codant pour une Tau physiologique marquée ne s'agrégeant pas spontanément.

Les différentes fractions obtenues par ultracentrifugations successives ont dans un premier temps été caractérisées de plusieurs façons (figure 22a).

1. Caractérisation des fractions enrichies en VE

a. Quantification des particules par NTA

L'enrichissement vésiculaire par ultracentrifugations successives permet d'obtenir à partir du milieu de culture des neurones infectés par un vecteur lentiviral codant pour la protéine tau 1N4R-V5, une fraction enrichie en grandes vésicules (GV) contenant $63,7 \pm 18,6\%$ de vésicules > 150 nm et une fraction enrichie en petites vésicules (PV) contenant $64,9 \pm 24,7\%$ de vésicules dont la taille est comprise entre 10 et 150 nm (figure 22 b,c). Il n'y a pas de différence répartition entre ces fractions que les neurones soient infectés ou non ou par un vecteur lentiviral codant pour une protéine tau 1N3R-V5 ou 1N4R-V5 (figure 22 b et c).

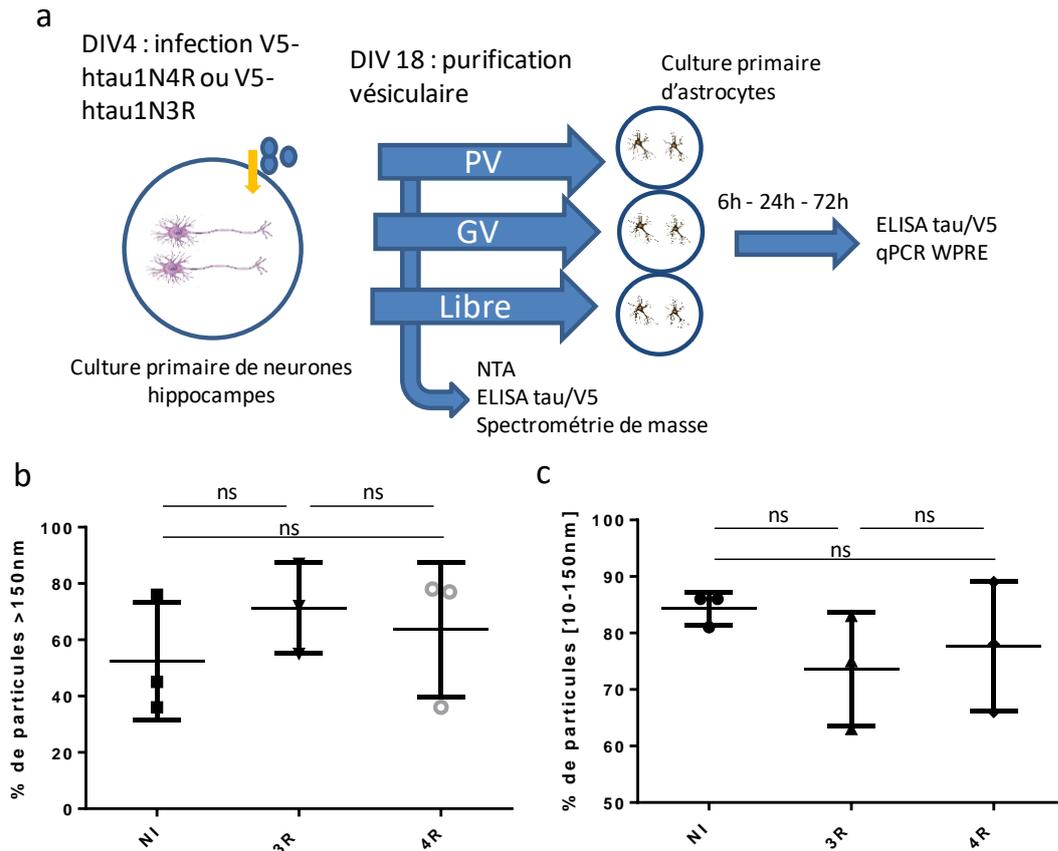


Figure 22 : Protocole expérimental et quantification des vésicules par NTA dans les différentes fractions.

a : schéma expérimental. Des cultures primaires de neurones de rats sont infectés par des vecteurs lentiviraux afin d'induire l'expression d'une protéine Tau humaine 1N3RV5 ou 1N4RV5. Quatorze jour après l'infection le surnageant est récupéré et centrifugé afin d'en extraire successivement une fraction enrichie en GV (culot après centrifugation à 20 000g), une fraction enrichie en PV (culot après centrifugation à 100 000g), et une fraction enrichie en protéines libres (surnageant après centrifugation à 100 000g). La concentration en particules est mesurée par NTA, la concentration de Tau-V5 par ELISA et la recherche de protéines vésiculaires est effectuée par spectrométrie de masse.

b : l'analyse par NTA montre une majorité de particules >150nm dans la fraction GV et une majorité de particules de 10-150nm dans la fraction PV. Il n'y a pas de différence de répartition des particules selon leur taille que les neurones n'aient pas été infectés (NI) ou qu'ils aient été infectés par un vecteur lentiviral codant pour une protéine tau 1N3RV5 (3R) ou 1N4RV5 (4R) aussi bien pour la fraction PV que pour la fraction GV. Test statistique de Kruskal-Wallis avec correction du risque α (a - d).

b. Spectrométrie de masse

L'analyse en spectrométrie de masse a été effectuée afin de contrôler la qualité des fractions enrichies en VE. Compte tenu de la faible concentration protéique dans les fractions PV et GV, ces deux fractions ont été additionnées et analysées ensemble. L'analyse a permis d'isoler 53 peptides pour les VE issues de neurones non infectés, 27 pour les vésicules Tau V5-h1N3R et 194 pour le V5-h1N4R. La comparaison du profil obtenu avec les bases de données RGD a montré 20% de protéines associées aux neurones pour les VE issues de cultures primaires de neurones non infectés, et environ 10% de protéines associées aux neurones pour les VE issues de cultures primaires de neurones infectés par un vecteur lentiviral. Le taux de protéines d'origine gliale était négligeable dans tous les cas. Cette analyse a permis de montrer que les fractions vésiculaires étaient principalement constituées de VE d'origine neuronale (figure 23a). La comparaison avec la base de données Vesiculpedia a permis de mettre en évidence

une majorité de protéines vésiculaires (NI: 75%, 3R: 62% et 4R: 57%) répertoriées dans cette base (figure 23b).

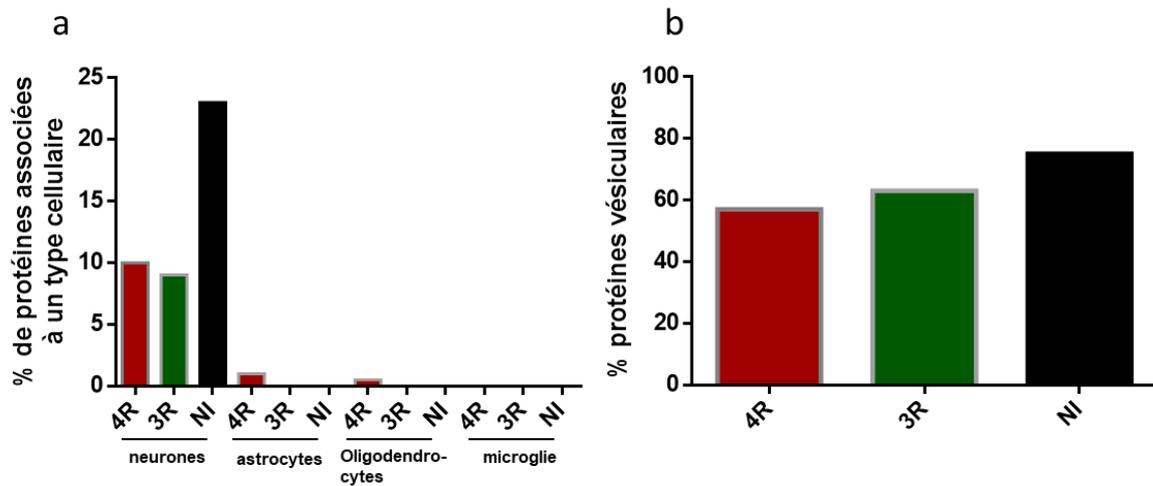


Figure 23 : Analyse par spectrométrie de masse des fractions vésiculaires

L'analyse en spectrométrie de masse a été effectuée sur les fractions PV et GV additionnées obtenues à partir du surnageant de cultures primaires de neurones exprimant une protéine tau humaine 1N3RV5 (3R) ou 1N4RV5 (4R) par infection par un vecteur lentiviral ou non infectés (NI). La comparaison du profil de spectrométrie obtenu avec la base de données RGD a permis de quantifier le pourcentage de peptides habituellement associés aux neurones, astrocytes, oligodendrocytes et cellules microgliales (a). La comparaison du profil de spectrométrie obtenu avec la base de données EXOCARTA a permis de quantifier le pourcentage de peptides habituellement trouvés dans les VE (b).

c. Les fractions enrichies en VE ne comportent pas de particules virales résiduelles. Afin de d'exclure l'infection des astrocytes par d'éventuelles particules lentivirales résiduelles qui seraient présentes dans les VE, nous avons effectué un calcul du nombre de copies virales intégrées dans l'ADN astrocytaire par qPCR selon Christodoulou et al. (236). Cette analyse qPCR a été faite sur des lysats astrocytaires préalablement traités pendant 72 heures par les fractions vésiculaires (PV et GV) et la fraction libre, issues du surnageant de cultures primaires de neurones, soit infectés par un lentivirus codant pour la Tau humaine 1N3RV5 ou 1N4RV5, soit non infectés.

Le calcul du nombre de copies virales intégrées dans le génome astrocytaire n'a pas montré de différence significative entre les astrocytes traités par les fractions enrichies en PV, GV et protéines libres issues de neurones infectés par rapport aux astrocytes traités par ces fractions issues de neurones non infectés (figure 24).

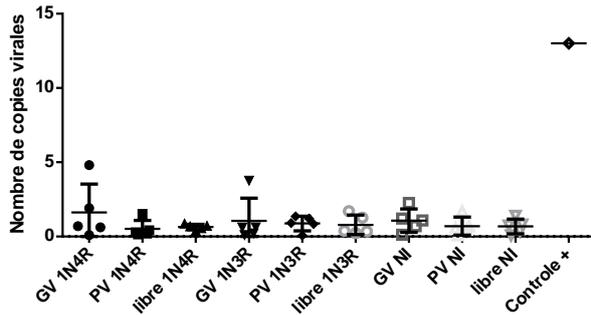


Figure 24 : Calcul par qPCR du nombre de copies virales présentes dans les fractions vésiculaires

Des cultures primaires de neurones de rats sont infectés par des vecteurs lentiviraux afin d'induire l'expression d'une protéine Tau humaine 1N3RV5 ou 1N4RV5. Seize jours après l'infection le surnageant est récupéré et centrifugé afin d'en extraire successivement une fraction enrichie en GV, une fraction enrichie en PV, et une fraction enrichie en protéines libres. Les lysats astrocytaires sont récupérés après 6h, 24h ou 72h d'incubation. Le nombre de copies virales est mesuré par qPCR. Test statistique de Kruskal-Wallis avec correction du risque α (a - d).

2. Mode de transfert de la protéine Tau neurones-astrocytes

Nous avons quantifié les modes de sécrétion par les neurones de protéines Tau étiquetées V5 en dosant ces protéines par ELISATau-V5 dans les différentes fractions (figure 23d). Cet ELISA utilise l'étiquette V5 comme épitope de capture et 2 segments centraux de la protéine Tau comme épitopes de révélation. 93,7% \pm 0,23 de la protéine Tau se retrouve sous forme libre, 4,6% \pm 0,37 est sécrétée dans la fraction GV et 2,1% \pm 0,28 dans la fraction PV (figure 23a).

Ces différentes fractions ont été utilisées pour traiter des cultures primaires d'astrocytes afin de déterminer leur efficacité de transfert de Tau. L'internalisation de la protéine Tau a été mesurée par dosage ELISATau-V5 dans les lysats astrocytaires en fonction de la durée d'incubation.

Le dosage ELISA sur les lysats astrocytaires traités pendant 6h et 24h par la fraction GV issues des neurones exprimant la Tau 1N3RV5 ou 1N4RV5, a permis de mettre en évidence un transfert de Tau de neurones vers les astrocytes (figure 25b).

Nous observons avec la cinétique que la concentration de Tau semble diminuer entre 6h, 24h et 72h (non significatif) (figure 25b). Il n'y avait pas de différence de transfert entre les isoformes (figure 25c). Les fractions PV et libres n'ont pas permis de transfert pour les 2 isoformes (figure 25b).

Afin d'évaluer l'efficacité de transfert en s'affranchissant de la concentration de Tau contenue dans les fractions GV, PV et libres, nous avons calculé la fraction de protéine Tau internalisée dans les astrocytes à 6h ($[\text{tau astrocyte 6h}] / [\text{tau milieu T0}]$). Celle-ci est plus élevée par les astrocytes traités par les GV et les PV que par les astrocytes traités par la fraction libre (figure 25e).

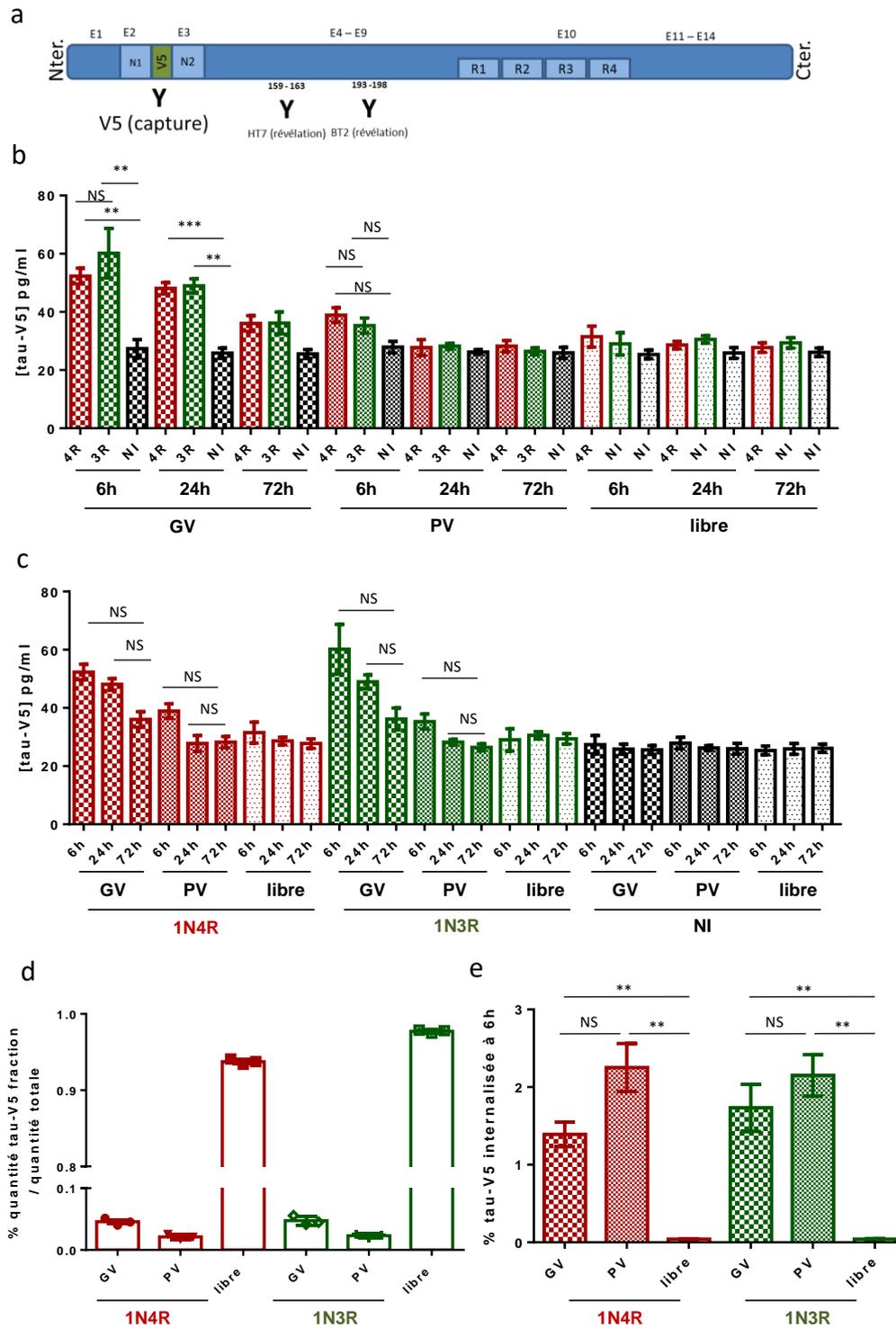


Figure 25 : Transfert de tau de neurone à astrocyte par les VE et la fraction contenant les protéines libres

Des cultures primaires de neurones de rats sont infectés par des vecteurs lentiviraux afin d'induire l'expression d'une protéine tau humaine 1N3RV5 ou 1N4RV5. Seize jour après l'infection le surnageant est récupéré et centrifugé afin d'en extraire successivement une fraction enrichie en GV, une fraction enrichie en PV, et une fraction enrichie en protéines libres. Les astrocytes en culture sont mis à incuber avec ces fractions. Après 6h, 24h ou 72h d'incubation les lysats astrocytaires sont récupérés. La concentration de Tau-V5 est mesurée par ELISA (anticorps de capture et de révélation sont représentés en a) dans les lysats astrocytaires (b et c) et dans les différentes fractions (représentée en % tau présente dans la fraction / tau-V5 sécrétée totale) (d). L'efficacité de transfert est évalué en calculant le pourcentage de tau-V5 internalisée est calculé en faisant le rapport ([tau astrocyte 6h] / [tau milieu T0]) (e). Test statistique de Kruskal-Wallis avec correction du risque α (b, c, e).

Dans cette troisième partie, avons montré :

1/ l'existence d'un transfert de protéine Tau de neurones à astrocytes.

2/ que ce transfert se fait, au moins en partie, par les grandes vésicules et qu'il ne dépend pas de l'isoforme 3R ou 4R de Tau.

Ces différentes analyses pourraient être néanmoins davantage le reflet d'un processus physiologique plutôt que pathologique, puisque ces différents modèles n'ont pas utilisé de la protéine Tau pathologique comportant des propriétés de recrutement.

Tableau 7 : Résultats principaux

<i>Matériels et méthodes</i>	<i>Nombre d'échantillons / Nombre d'expériences</i>	<i>Résultats/conclusions</i>
FRET	10 MA, 5 PiD, 5 PSP, 5 Témoins	Les VE extraites d'ISF de cerveaux de patients atteints de MA contiennent de la Tau comportant des propriétés de recrutement
FRET	Plasmas humains (contrôles n=13, MA=28) LCR lombaires non ecTAUsomes : contrôles n=30, MA=34)	Les VE extraites de LCR lombaires et de plasma de patients atteints de MA n'induisent pas de signal FRET
NTA	ecTAUsome (VE extraites de plasmas et LCR ; n=37)	Il n'y a pas de différence sur le nombre de vésicules entre les différents groupes aussi bien sur le plasma que sur le LCR
Culture en chambres microfluidiques neurones astrocytes	n =3	La protéine Tau peut être transférée de neurones à astrocytes
Transfert sur des cultures astrocytaires de milieu conditionné par des cultures de neurones	n =3	En l'absence de contact direct neurones/astrocytes, le transfert de Tau se fait majoritairement par les VE.

DISCUSSION

Il est admis depuis plusieurs années que la protéine Tau a des propriétés communes avec la protéine prion : recrutement/nucléation, propagation. La propagation implique le transfert de protéines Tau pathologiques d'une cellule à l'autre et leurs voies sont en cours de démembrement. Il a été montré que la protéine Tau était sécrétée dans les VE sans que l'on sache s'il s'agit d'un processus physiologique et/ou pathologique. Dans ce travail nous avons montré que de la protéine Tau comportant des propriétés de recrutement est présente dans les VE de l'ISF de patients atteints de MA. Ces VE sont capables d'induire de la pathologie *in vivo*. Ces résultats montrent que les VE sont impliquées dans la physiopathologie de la MA et nous indiquent qu'il va être important de mieux comprendre leur rôle.

I. Fractionner les fractions... pour mieux les comprendre l'origine des VE

Dans la première partie de ce travail nous avons montré que la SEC est une méthode intéressante d'extraction de VE, permettant de s'affranchir de contaminations par les macroprotéines. Cette technique a également la caractéristique de ne pas être sélective sur le type de VE comme certaines techniques de purification basées sur de l'immunoprécipitation utilisant des marqueurs d'exosomes (exoquick..). Néanmoins, nous ne sommes pas parvenus à purifier les VE en fonction de leur taille. Cela aurait permis d'étudier des fractions enrichies en GV, majoritairement constituées d'ectosomes, et en PV majoritairement constituées d'exosomes.

L'étude d'un pool de VE (toutes tailles confondues) nous a permis de montrer que des espèces de Tau comportant un potentiel de recrutement étaient présentes dans le milieu extracellulaire cérébral des souris Tg30Tau, mais également de patients atteints de MA.

Ce pool de VE est néanmoins le résultat de divers mécanismes cellulaires. Nous savons en effet que la biogénèse des exosomes, des ectosomes et des corps apoptotiques se réalise par des processus différents. La sécrétion de VE dans le système nerveux central, leur passage dans le LCR et le plasma sont des processus physiologiques puisque des VE d'origine cérébrale ont été trouvées dans le LCR et le sang de sujets sains (198, 220, 221). Certains auteurs décrivent la sécrétion d'ectosomes comme une réaction au stress cellulaire alors que la sécrétion d'exosomes serait un mécanisme physiologique finement régulé. A titre d'exemples, la sécrétion de récepteurs des neurotransmetteurs par les exosomes est régulée par l'activité neuronale et permet la régulation de leur excitabilité (237). Aussi, le glutamate induit une entrée de Ca²⁺ dans les oligodendrocytes et provoque ainsi une sécrétion d'exosomes (238). Néanmoins, *in vitro*, la présence de protéines Tau dans les exosomes semble être induite par sa surexpression ou sa phosphorylation ; sa sécrétion dans les ectosomes serait par contre physiologique et pathologique (148,163).

Notre étude, basée sur un pool de VE, ne permettait pas non plus de déterminer l'origine cellulaire des VE comportant des espèces de protéines Tau pathologiques. Pourtant, le liquide interstitiel est un secteur d'échange entre les différentes cellules cérébrales ; il est donc probable qu'il contienne des VE d'origine neuronale et gliale, ces dernières permettant la communication des différents types cellulaires. A titre d'exemple, il a été montré que les

exosomes isolés du milieu de culture de neurones corticaux primaires de souris contiennent des miRNA comme le miR-124a, et sont internalisés par les astrocytes. Ce processus entraîne une régulation positive du transporteur d'acides aminés excitateur 2 (EAAT2; également connu sous le nom de GLT1) (239). Le fait que la protéine Tau soit transcrite et traduite dans les neurones nous pousse à croire que ces VE comportant des espèces pathologiques de Tau sont d'origine neuronale mais on peut imaginer que la protéine Tau ait été internalisée dans les cellules gliales avant d'être resécrétée dans le milieu extracellulaire par les VE. L'internalisation de la protéine Tau pathologique, agrégée ou non, pourrait se faire par les différentes voies d'internalisation décrites dans l'introduction (non spécifiques des neurones), mais aussi par phagocytose de neurones apoptotiques (191). Une fois phagocytés, les agrégats de protéines Tau contenus dans les neurones pourraient être dégradés et/ou resécrétés dans l'ISF et/ou le sang et/ou le LCR dans des VE.

De plus L'utilisation des cellules TauRDP301SFRET est une méthode permettant d'étudier le contenu des VE en s'affranchissant de leur adressage car nous avons détruit les VE par sonication et utilisé un agent de transfection. Or nous savons que les protéines entrant dans la composition de la membrane des VE peuvent être responsables d'un adressage cellule spécifique.

Par la suite, nous pourrions déterminer la nature des VE contenant des espèces pathologiques de Tau en utilisant des méthodes d'immuno-précipitation par des marqueurs d'exosomes ou d'ectosomes avant de traiter les cellules biosenseurs TauRDP301SFRET avec les VE ainsi sélectionnées.

Pour connaître l'origine cellulaire des VE nous envisageons d'effectuer des méthodes d'immuno-précipitation par des marqueurs astrocytaires (GLAST) ou neuronaux (L1CAM) comme cela a été décrit par Goetzl et collaborateurs (214). Nous pourrions ensuite déterminer le potentiel de recrutement de ces VE ainsi sélectionnées en fonction de leur origine cellulaire, sur notre système utilisant les cellules biosenseurs TauRDP301SFRET.

Afin d'étudier spécificité la spécificité d'adressage des VE nous pourrions traiter des cultures primaires de neurones et/ou de cellules gliales ou dérivées de CSPi équipées du biosenseurs Tau-GFP/Tau-CFP, avant de les observer en microscopie à fluorescence pour détecter le transfert d'énergie.

II. La vulnérabilité neuronale, une piste pour expliquer les différences entre les Tauopathies

Nous avons principalement détecté de la protéine Tau pathologique dans les VE extraites de l'ISF de patients atteints de MA. Le signal n'était pas significatif pour les patients atteints de PSP mais une tendance semble se dégager (probable manque de puissance statistique à cause de la taille de l'effectif). En tout état de cause, le signal induit par les VE de patients atteints de PSP ou de Pick est bien inférieur à celui induit par les VE de patients atteints de MA. Cette différence est probablement le reflet de l'hétérogénéité des voies de propagation entre les Tauopathies. D'autre part, cela corrobore les données neuropathologiques montrant une atteinte très diffuse du parenchyme cérébral dans la MA à des stades tardifs, contrairement à la PSP ou à la maladie de Pick dans lesquelles l'atteinte cérébrale est plus restreinte et semble davantage liée à de la connectivité neuronale(240). Il serait aussi intéressant d'analyser des

VE de patients atteints de DCB car cette pathologie comporte du point de vue neuropathologique une atteinte très diffuse. Aussi, il est possible que les mécanismes de propagation de la protéine Tau soient différents en fonction du stade évolutif de la maladie. En effet, dans la MA, les aires atteintes de manière séquentielle sont connectées par voie neuronale dans les stades précoces de la maladie. Néanmoins dans les stades tardifs où l'atteinte est relativement diffuse, la connexion neuronale des différentes aires atteintes est moins évidente ; cela est peut être le reflet de voies de propagation différentes. Il serait donc intéressant d'étudier les voies de propagation au stade précoce de la maladie ; cela est d'autant plus intéressant que, pour être efficace, les thérapeutiques devront s'adresser à des patients peu symptomatiques. La cohorte ecTAUosome devrait pouvoir répondre à certaines de ces questions et nous envisageons d'analyser des cerveaux autopsiques atteints de MA à des stades plus précoces.

Pour la MA, la PSP et la maladie de Pick, le calcul du coefficient de corrélation de Spearman (r^2) a montré une corrélation forte entre les données de FRET sur les VE, les données de FRET sur les culots cellulaires et la quantification du signal IHC AT8, ce qui signifie que la présence de protéines Tau pathologiques dans les VE semble corrélée à la charge lésionnelle intracellulaire (culots) et globale (IHC). Cela pourrait signifier que la présence de VE est secondaire aux dépôts de protéines Tau et qu'elles pourraient être un processus d'élimination des espèces toxiques. Cependant, le nombre de cerveaux étudiés (PSP : n=5, PiD : n=5, MA : n=10) nous a empêché d'effectuer des analyses de corrélation région par région. Pourtant il semble que le signal FRET induit par les VE et les culots soit présent dans certaines régions en l'absence de marquage immunohistochimique. Cela signifie que le signal FRET précède les dépôts visibles en immunohistochimie. D'ailleurs, Kauffman et collaborateurs ont montré que le signal FRET induit par le lysat tissulaire total, était parfois présent en l'absence de lésion de Tau visible en immunohistochimie (241). Cela pourrait s'expliquer par une vulnérabilité de certaines espèces neuronales, c'est-à-dire que des VE ayant un potentiel de recrutement sont présentes dans ces régions mais que les cellules n'y sont pas permissives. Cela pourrait également s'expliquer par une meilleure sensibilité du FRET par rapport à l'immunohistochimie. L'hypothèse de vulnérabilité est corroborée par les observations neuropathologiques. Par exemple, il a été montré dans la MA, que les neurones comportant de la DNF comportent de nombreuses interconnexions. Néanmoins, les cellules granulaires du gyrus denté, qui reçoivent la majeure partie des projections des neurones perforants du cortex entorhinal pourtant atteints précocement dans la MA, comportent rarement de la DNF (242). De plus, dans la maladie de Pick, ces mêmes cellules granulaires comportent très fréquemment des corps de Pick (34). Ces différences seraient dues à la vulnérabilité des populations neuronales à certains types de dépôts de protéines Tau, et en particulier aux différentes espèces et souches (240).

Il est également frappant de voir les différences de schéma de propagation des différentes Tauopathies. Certaines pathologies sont relativement focales (maladie de Pick ou maladie des grains argyrophiles) et d'autres plus diffuses (AGD, PSP et AD). Cela suggère une différence de propagation de la pathologie Tau mais aussi une vulnérabilité des neurones non seulement à la souche de Tau, mais aussi à la manière dont les espèces de protéines Tau sont transportées, ces deux phénomènes pouvant d'ailleurs être liés. On peut par exemple imaginer que certains neurones expriment des récepteurs permettant l'internalisation d'un type spécifique de VE. Dans ce cas, l'internalisation répétée de VE chargées d'espèces pathologiques de Tau et

provenant de régions distantes, aboutiraient à des dépôts intracellulaires dans des cellules spécifiques.

III. Le transport des VE est-il synaptique ou extra-synaptique ?

Nous avons validé le caractère extracellulaire des ISF en montrant l'absence de contamination par des protéines cytoplasmiques ou nucléaires. Par contre nous n'avons pas déterminé si notre méthode d'extraction comportait le milieu extracellulaire synaptique et extrasynaptique ou si, en raison du respect de l'intégrité synaptique lors des dissociations mécaniques et enzymatiques, les synapses étaient culottées avec les cellules. Or plusieurs travaux ont mis en évidence la présence de Tau dans la synapse dans des conditions pathologiques chez l'humain et dans des modèles animaux de Tauopathies (136,243–245). Des travaux *in-vitro* suggèrent fortement que la synapse pourrait participer à la propagation de protéines pathologiques (118).

Pour cela nous pourrions étudier le culot cellulaire en microscopie électronique afin de déterminer si les synapses sont intègres ou faire un dosage de protéines synaptiques (SNARE par exemple) sur l'ISF. Déterminer si la propagation se fait par la synapse est intéressant car il s'agit *in vivo* d'un espace clos, peu accessible aux thérapeutiques. De plus les astrocytes entrant dans la constitution de la synapse, cela pourrait expliquer une voie de transfert de protéines Tau de neurone à astrocyte.

IV. Le modèle biosenseur utilisé est-il capable de mesurer les capacités de recrutement ?

La détection de protéine Tau pathologique est basée dans ce travail sur l'utilisation du modèle cellulaire de FRET. Or nous avons vu dans l'introduction qu'une difficulté majeure dans l'étude des Tauopathies est la détection des espèces de Tau pathologiques puisqu'à l'heure actuelle la définition de « protéine Tau pathologique » est relativement floue. Aujourd'hui le modèle de biosenseur basé sur le transfert d'énergie est considéré comme le plus spécifique pour la détection d'espèces de Tau comportant des propriétés de recrutement. Néanmoins ce modèle a des limites : le recrutement se fait sur un fragment de protéine Tau mutée, alors qu'il est probable que dans les Tauopathies sporadiques le recrutement se fasse sur de la protéine Tau sauvage entière, tronquée et/ou comportant des modifications post traductionnelles. Par ce modèle il a été montré la présence de souches comportant un pouvoir de recrutement plus ou moins important (246), ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, les variations que nous avons vues, à la fois au sein d'une même pathologie et entre les pathologies. Il serait intéressant de tester nos échantillons sur le biosenseur basé sur la chimiluminescence avec les fragments de Tau muté $\Delta K280$ (118) couplés à la luciférase, ou de développer un système similaire avec de la Tau sauvage et/ou d'autres mutations, afin de déterminer si le potentiel de recrutement d'une souche dépend du fragment de protéine Tau utilisé dans le système de détection.

Aussi, le développement de techniques de RT-QUIC spécifiques des isoformes 3R ou 4R (125–127) semble efficace pour les Tauopathies 3R ou 4R « pures » mais manque de sensibilité pour les Tauopathies mixtes comme la MA. De plus, elles reposent également sur le recrutement de fragments de Tau mutée, induisant des limites similaires à celles décrites dans les modèles cellulaires. De plus, les techniques de RT-QUIC mettent en évidence des propriétés de recrutement mais pas la conversion de protéine normale en protéine pathologique. Le développement d'une technique de PMCA capable de mettre en évidence les propriétés de conversion semble primordial pour départager les mécanismes physiologiques des mécanismes pathologiques.

V. Gradient de Tau pathologique du LCR-V au LCR-PL

Nos résultats semblent montrer la présence de protéines Tau ayant des propriétés de recrutement dans le LCR-V mais pas dans le LCR-PL. Cela signifie que ces espèces sont sécrétées dans le LCR puis réabsorbées avant leur arrivée dans la région lombaire. Classiquement, il est décrit une sécrétion du LCR par les plexus choroïdes, une réabsorption au niveau des villosités arachnoïdiennes et une circulation cranio-caudale (154). Depuis, il a été montré que le LCR est sécrété à la fois par les plexus choroïdes mais également par les cellules épendymaires et possiblement par le parenchyme cérébral lui-même (247,248,248,249). D'autre part, il serait au moins en partie réabsorbé par les espaces de Virchow-Robin vers le système lymphatique cérébral (247). Aussi, il a été montré que les plexus choroïdes avaient un rôle d'absorption de certaines substances du LCR (250). Le fait que le LCR ne soit pas uniquement sécrété par les plexus choroïdes et donc uniquement dérivé du sang, mais également sécrété par l'épendyme et le parenchyme cérébral nous permet de mieux comprendre comment des VE chargée de Tau peuvent être présentes dans le LCR (figure 26). Nous pouvons également penser que certaines protéines du LCR sont réabsorbées au niveau des espaces de Virchow Robin par le système glymphatique mais également au niveau des plexus choroïdes. D'ailleurs, des dépôts amyloïdes appelés corps et anneaux de Biondy comportant à la fois des lipofushines, de la β -amyloïde et de la protéine Tau sont décrits dans les plexus choroïdes (251). La réabsorption de protéines pathologiques présentes dans le LCR pourrait expliquer leur formation. D'autre part été montré qu'une altération du système lymphatique cérébral aboutit à une augmentation de dépôts de β -amyloïde de Tau (252) ce qui pourrait être à l'origine de l'encéphalopathie post-traumatismes chroniques. Il semble donc important de comprendre à quel niveau se fait la réabsorption de la protéine Tau du LCR-V et quel est son rôle dans la physiopathologie des Tauopathies.

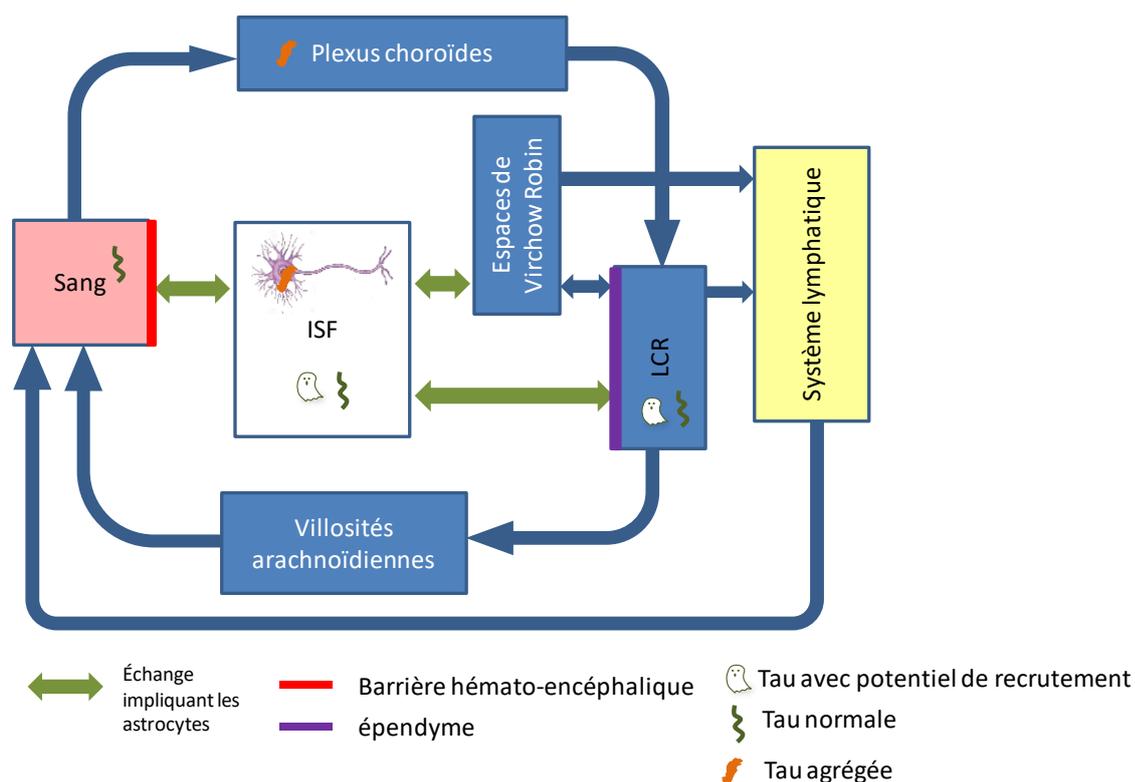


Figure 26 : Compartiments cérébraux, leurs barrières et leurs échanges. Les différents compartiments du cerveau sont limités par des barrières anatomiques permettant des échanges régulés. Le liquide interstitiel (ISF) « baigne » les neurones et les cellules gliales. Les échanges entre l'ISF d'une part et le sang, le LCR et le système lymphatique (par les espaces e Virchow-Robin) d'autre part, sont régulés par les astrocytes. Les plexus choroïdes constituent un secteur d'échange entre le sang et le LCR. Ce dernier est majoritairement drainé dans les espaces de Virchow Robin. De la protéine Tau pathologique a été décrite dans l'ISF, le LCR et les plexus choroïdes. De la protéine Tau normale a été décrite dans le sang. Les différentes flèches et barrières mettent en lueur les potentielles voies de transfert de Tau dans le cerveau.

VI. Que deviennent les espèces pathologiques de Tau identifiées dans le LCR ventriculaire ?

Nous n'avons pas détecté de protéines Tau avec potentiel de recrutement dans le plasma de patients atteints de MA. Pourtant, avec le développement de techniques de dosages protéiques ultra-sensibles, la protéine Tau phosphorylée ou non, a été détectée dans le plasma (169,170,233,234,253,254) ; cela pourrait être dans le futur une aide au diagnostic de MA. Or, les espèces pathologiques sécrétées dans le LCR-V sont probablement réabsorbées et éliminées par le système lymphatique ou directement dans le sang. Il est donc peu probable que la protéine Tau ne transite pas à un moment par le sang avant d'être dégradée, à moins que celle-ci ne soit dégradée dans le système lymphatique avant son passage au niveau plasmatique. Il est par contre possible que son passage plasmatique soit très transitoire et que sa concentration soit trop faible pour que l'on détecte un potentiel de recrutement. Là encore, le développement d'un système de PMCA semble primordial. Il est également possible qu'elle ne soit pas sous forme vésiculaire mais sous forme libre ou contenue dans les cellules sanguines. Il a d'ailleurs été montré que la protéine Tau était présente dans les plaquettes et que son dosage pouvait être utilisé comme biomarqueur de la MA (255). Afin d'approfondir les résultats obtenus il serait intéressant de rechercher de la protéine Tau avec potentiel de

recrutement dans les autres compartiments sanguins et par des technologies plus sensibles comme la PMCA, qui restent néanmoins à développer.

VII. Les voies de transfert de protéines Tau de neurones à astrocytes

Dans ce travail de thèse, nous avons mis en évidence un transfert de protéine Tau soluble de neurones à astrocytes, ce qui n'avait jamais été décrit auparavant. Ce transfert semble se faire par via la sécrétion de grandes VE.

L'internalisation d'oligomères de Tau recombinante par les astrocytes en culture a été montrée par plusieurs équipes (166,206,213). Asai et collaborateurs ont montré que l'internalisation des fibrilles était moins efficace par les astrocytes que par la microglie (166).

Notre utilisation de chambres microfluidiques, technique excluant le contact soma/soma, privilégie donc le contact axone/soma, comme c'est le cas dans une synapse. Bien que la voie directe ne soit pas exclusive dans ces modèles, il semble que la proximité soit importante puisque la grande majorité des astrocytes comportant un marquage Tau étaient en contact d'un ou plusieurs axones marqués. Le transfert de Tau pourrait également se faire par les nanotubes comme cela a été montré entre neurones. Cependant, ces chambres de cultures ne permettent pas d'assurer qu'il existe réellement un passage transynaptique. Des études complémentaires en vidéomicroscopie et en microscopie de super résolution, permettant de visualiser des structures dont la taille est de l'ordre du nanomètre, devraient pouvoir résoudre cette incertitude (256).

Le fractionnement vésiculaire nous a permis de montrer que le transfert de protéine Tau de neurones à astrocytes pouvait se faire par voie vésiculaire, principalement par les fractions enrichies en GV. Néanmoins, compte tenu de la plus faible quantité de Tau sécrétée dans les PV, le rapport (Tau sécrétée par les neurones) / (Tau internalisée par les astrocytes) est plus important pour les PV que les GV. Cela signifie que l'efficacité d'internalisation des PV dans les astrocytes semble supérieure à celle des GV. Malgré une très forte proportion de Tau présente sous forme libre dans le milieu de culture, nous n'avons pas montré de transfert dans les astrocytes sous cette forme. Cela signifie que la Tau soluble nécessite d'être sécrétée sous forme vésiculaire pour être internalisée, contrairement à ce qui a été montré dans des études utilisant des protéines recombinantes sous forme fibrillaire (166,206,257).

VIII. Rôle du transfert de Tau de neurones à astrocytes

L'analyse en cinétique de la concentration de protéine Tau retrouvée dans les astrocytes suggère que celle-ci soit probablement clivée ou dégradée et devienne ainsi indétectable par ELISA.

Il a déjà été montré sur des lignées cellulaires que le lysosome avait un rôle important dans la dégradation de l' α -synucléine puisque son inhibition induit une accumulation d' α -synucléine(258). Aussi, la manière dont la protéine Tau est internalisée dans les astrocytes pourrait décider de son devenir : dégradation, recyclage, troncation... Il semble que la dégradation de la protéine Tau se fasse par le protéasome et par autophagie(259). Dans plusieurs modèles animaux de Tauopathie il a été montré un rôle bénéfique de l'activation du protéasome et de l'autophagie et un rôle néfaste de leur inhibition (260–262). Cependant in

in vitro il a été montré que l'activation de l'autophagie, en produisant des fragments pro-agrégatifs, contribuait à la formation d'agrégats de protéine Tau (259). Dans ces études sur lignées cellulaires ou *in vivo*, il n'est pas possible de déterminer le rôle spécifique des astrocytes. Aussi, le type de protéine Tau internalisée (soluble, monomérique, oligomérique ou fibrillaire) est probablement déterminante sur la manière dont elle est processée dans l'astrocyte.

A la lueur de nos données et de celles de la littérature, nous proposons 3 hypothèses sur le rôle du transfert de Tau de neurones à astrocytes. Il pourrait être 1/ *secondaire mais néfaste* par la génération de formes toxiques (tronquées, hyperphosphorylées, proagréatives). Ces formes pourraient avoir un effet toxique local et à distance par leur propagation. 2/ *secondaire mais bénéfique* par élimination d'espèces toxiques de Tau, présentes en trop grandes quantités ; cette élimination pourrait se faire par le protéasome par ubiquitinylation ou par autophagie (en particulier pour les formes tronquées ne comportant pas de site d'ubiquitinylation) (263). 3/ *central* : les Tauopathies pourraient être des maladies des cellules gliales. Les formes toxiques de protéines Tau seraient produites tout au long de la vie en faibles quantités mais sans effet grâce à un système d'élimination efficace. Une dysfonction gliale, soit par sénescence, soit par diminution du nombre de cellules gliales, ne permettrait plus cette élimination aboutissant ainsi à leur accumulation, ce qui aurait un effet neurotoxique. Il a d'ailleurs été montré dans les stades précoces de MA une diminution du nombre d'astrocytes dans l'hippocampe (264–266).

Ces hypothèses ne sont pas exclusives les unes des autres, et le rôle des astrocytes est probablement différent d'une Tauopathie à l'autre, comme le souligne la différence de morphologie et d'abondance des inclusions gliales dans les différentes maladies. Pour explorer ces hypothèses nous allons traiter des cultures primaires d'astrocytes avec des fractions enrichies en VE et protéines libres extraites de l'ISF de cerveaux de patients atteints de Tauopathie. Nous allons ensuite doser en cinétique les espèces toxiques de Tau, à la fois dans le milieu de culture et dans les lysats astrocytaires. La mesure dans les lysats astrocytaires va nous permettre de voir si les espèces toxiques de Tau sont internalisées. La mesure dans le milieu de culture devrait nous permettre de comprendre si les astrocytes sont capables de dégrader les espèces toxiques ou si au contraire ils participent à en générer de nouvelles. Néanmoins, du fait de la présence de VE d'origine astrocytaire dans le plasma, comportant de la protéine Tau phosphorylée (214) nous pensons que les astrocytes ont un rôle important dans le clearing de Tau.

CONCLUSION

Après avoir montré que la protéine Tau avait des propriétés communes avec la protéine prion, les tauistes essaient, depuis plusieurs années de démembrer les voies de propagation de Tau.

Dans ce travail nous démontrons la présence de protéine Tau ayant des propriétés de recrutement dans les VE extraites du liquide interstitiel cérébral de patients atteints de MA. Ces espèces ne sont pas présentes dans les VE de l'ISF de patients atteints de PSP ou de PiD. Ces espèces pathologiques de Tau semblent également présentes dans le LCR ventriculaire mais pas dans le LCR lombaire.

Nous avons également démontré que les VE de l'ISF de patients atteints de MA sont capables d'induire de la pathologie intraneuronale dans l'hippocampe de cerveaux de souris transgéniques exprimant une Tau humaine mutée.

Enfin, nous avons également démontré *in vitro* l'existence d'un transfert de protéine Tau de neurones à astrocytes se faisant au moins en partie par les grandes vésicules extracellulaires.

Annexes :

Tableau I : LCR (non ecTAUosomes)

Sexe	Age	MMS	Diagnostic	Ab42	Tau	P-Tau	Ab1-40	Ab42/40
M	51	20/30	Anxiété	1420	259	54		
F	43	25/30	Démence vasculaire	1216	186	44		
M	54	28/30	Trouble bipolaire	1374	248	53		
M	55	18/30	Amnésie post-traumatique	1317	221	46		
M	86	21/30	Démence vasculaire	746	355	62	13207	0.056
M	72	25/30	Maladie de Parkinson	905	314	56		
M	53	14/30	Démence vasculaire	1110	217	45		
M	67	27/30	FTD (no tau)	854	393	52		
F	46	26/30	Anxiété	1580	375	71	14632	0.108
F	71	18/28	Démence vasculaire	1301	230	43		
F	87	21/30	Anxiété	963	557	72	11508	0.084
F	62	23/30	Démence vasculaire	1188	143	31		
F	39	?	Anxiété	1017	150	34		
F	62	24/30	Anxiété	1282	319	61	12720	0.101
F	54	26/30	Démence vasculaire	1598	267	54		
F	75		MA	700	623	102	11432	0.061
F	71		MA	518	918	109		
M	60		MA	490	656	94		
F	59		MA	635	947	109		
M	66		MA	600	1001	139		
F	75		MA	790	504	84	8065	0.098
F	79		MA	574	481	79		
F	65		MA	830	1106	151	11978	0.069
F	44		MA	464	>2491	275	14245	0.033
M	62		MA	825	472	80	10549	0.078
F	74		MA	581	842	108		
F	74		MA	816	579	98		
F	58		MA	532	939	119		
F	77		MA	513	542	84		
M	66		MA	701	514	74	8659	0.081
M	63		MA	770	457	62	9926	0.078
M	64		MA	678	500	80		
F	50		MA	784	860	104	13475	0.058
F	69		MA	697	419	73		
M	58		MA	649	861	107		
M	79		MA	801	698	102	16295	0.049
F	58		MA	553	607	86		
F	64		MA	616	539	70		
M	70		MA	324	435	66	6244	0.052
M	74		MA	693	430	67		
F	73		MA	682	840	138		
F	68		MA	570	694	97		
F	58		MA	552	1840	275		
F	72		MA	740	438	71	8853	0.084
M	54		MA	789	354	66	10677	0.074
M			MA	583	332	54	5936	0.098
F	54		MA	459	888	100		
F	76		MA	758	439	70	11437	0.066
F	65		MA	581	1236	144		

Tableau II : LCR post mortem

Sexe	Age décès (¹)	DPM (²)	Diagnostic	Braak	Thal	Mode de (³)
F	59	40	CBD			IV
M	77	35	CBD/SLA			IV
F	67	27	AD	VI	5	IV
F	87	37	Démence			IV
F	79	16	AD	VI	5	PL
M	80	38	AGD			PL
F	65	15	DLFT TDP43 type C			PL

Tableau III : plasmas (non ecTAUsomes)

Sexe	Age	Diagnostic	MMS
F	60	MA	0
F	60	MA	4
F	61	MA	0
F	62	MA	21
F	60	MA	1
F	57	MA	21
F	63	MA	21
F	62	MA	0
M	56	MA	19
F	53	MA	1
M	66	MA	1
M	66	MA	22
M	61	MA	3
M	58	MA	22
M	59	MA	23
F	64	MA	4
M	62	MA	0
F	64	MA	0
M	56	MA	1
F	58	MA	21
F	68	MA	0
M	60	MA	2
F	62	MA	1
F	58	MA	1
M	55	MA	27
M	66	MA	15
M	84	MA	24
F	59	MA	17
Sexe	Age	Diagnostic	
M	36	Myotonie de Steinert	
F	17	/	
M	16	/	
F	38	Ependymome	
F	50	Adénome	
M	14	Diabètes	
M	15	Diabetes	
F	41	Dépression	
F	41	Neurofibromatose	
F	64	Melanome	
F	49	/	
M	76	/	
F	28	Sclérose tubéreuse	

Tableau IV : Cerveaux autoptiques

<i>Sexe</i>	<i>Age décès (a)</i>	<i>DPM (h)</i>	<i>Diagnostic</i>	<i>Braak</i>	<i>Thal</i>	<i>ApoE</i>	<i>Cause de décès</i>
M	78	19	CTRL	0	0		Aspergillose
F	82	NA	CTRL	I	1		Péricardite
M	23	24	CTRL	0	0		Myocardite
M	59	13	CTRL	0	0		Choc septique
M	41	11	CTRL	0	0		Etouffement
M	70	30	MA	VI	4	E4/E4	
F	63	15	MA	VI	4	E4/E4	
F	60	24	MA	VI	5	E4/E4	
F	82	84	MA	VI	5	E4/E4	
F	87	24	MA	VI	5	E4/E4	
F	71	4	MA	VI	4	E3/E3	
M	64	20	MA	VI	4	E3/E3	
M	66	27	MA	VI	5	E3/E3	
F	66	16	MA	VI	4	E3/E3	
M	69	6	MA	VI	4	E3/E3	
M	74	9	PSP	0	1		
M	90	36	PSP	0	2		
M	88	3	PSP	II	4		
M	69	17	PSP	I	0		
F	79	4	PSP	0	0		

Références bibliographiques

1. Kovacs GG, Xie SX, Robinson JL, Lee EB, Smith DH, Schuck T, et al. Sequential stages and distribution patterns of aging-related tau astrogliopathy (ARTAG) in the human brain. *Acta Neuropathol Commun.* 11 juin 2018;6(1):50.
2. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 juin 1998;95(13):7737-41.
3. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature.* juin 1998;393(6686):702-5.
4. Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, et al. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 1998;43(6):815-25.
5. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* mai 1975;72(5):1858-62.
6. Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci.* 1 juin 1986;83(11):4044-8.
7. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci.* 1 juill 1986;83(13):4913-7.
8. Pollock NancyJ, Mirra SuzanneS, Binder LesterI, Hansen LawrenceA, Wood JohnG. FILAMENTOUS AGGREGATES IN PICK'S DISEASE, PROGRESSIVE SUPRANUCLEAR PALSY, AND ALZHEIMER'S DISEASE SHARE ANTIGENIC DETERMINANTS WITH MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN, TAU. *The Lancet.* 22 nov 1986;328(8517):1211.
9. Delacourte A, Defossez A. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci.* 1 déc 1986;76(2):173-86.
10. Brion J-P, Flament-Durand J, Dustin P. ALZHEIMER'S DISEASE AND TAU PROTEINS. *The Lancet.* 8 nov 1986;328(8515):1098.
11. Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M. Phosphorylated Tau Protein Is Integrated into Paired Helical Filaments in Alzheimer's Disease. *J Biochem (Tokyo).* 1 janv 1986;99(6):1807-10.
12. Yen SH, Crowe A, Dickson DW. Monoclonal antibodies to Alzheimer neurofibrillary tangles. 1. Identification of polypeptides. *Am J Pathol.* août 1985;120(2):282-91.
13. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 1 oct 1985;101(4):1371-8.
14. Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol.* 24 juin 2002;157(7):1187-96.
15. Kellogg EH, Hejab NMA, Poepsel S, Downing KH, DiMaio F, Nogales E. Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science.* 15 juin 2018;360(6394):1242-6.

16. Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin M-L, Grognet P, Bombois S, et al. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics*. avr 2008;5(2):207-24.
17. Goedert M, Eisenberg DS, Crowther RA. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*. 25 juill 2017;40(1):189-210.
18. Berriman J, Serpell LC, Oberg KA, Fink AL, Goedert M, Crowther RA. Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross- β structure. *Proc Natl Acad Sci*. 22 juill 2003;100(15):9034-8.
19. Falcon B, Zhang W, Schweighauser M, Murzin AG, Vidal R, Garringer HJ, et al. Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018;136(5):699-708.
20. Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci*. 1 juin 1988;85(11):4051-5.
21. Wischik CM, Novak M, Thøgersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, et al. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci*. 1 juin 1988;85(12):4506-10.
22. Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci*. 1 juill 1988;85(13):4884-8.
23. Arima K. Ultrastructural characteristics of tau filaments in tauopathies: Immuno-electron microscopic demonstration of tau filaments in tauopathies. *Neuropathology*. 1 oct 2006;26(5):475-83.
24. Fitzpatrick AWP, Falcon B, He S, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, et al. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*. juill 2017;547(7662):185-90.
25. Taniguchi-Watanabe S, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tarutani A, et al. Biochemical classification of tauopathies by immunoblot, protein sequence and mass spectrometric analyses of sarkosyl-insoluble and trypsin-resistant tau. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016;131:267-80.
26. Ferrer I, Lopez-Gonzalez I, Carmona M, Arregui L, Dalfo E, Torrejon-Escribano B, et al. Glial and Neuronal Tau Pathology in Tauopathies: Characterization of Disease-Specific Phenotypes and Tau Pathology Progression. *J Neuropathol*. 2014;73(1):81-97.
27. Yoshida M. Astrocytic inclusions in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Neuropathology*. 1 sept 2014;n/a-n/a.
28. Kovacs GG, Lukic MJ, Irwin DJ, Arzberger T, Respondek G, Lee EB, et al. Distribution patterns of tau pathology in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol (Berl)*. août 2020;140(2):99-119.
29. Ikeda C, Yokota O, Miki T, Takenoshita S, Ishizu H, Terada S, et al. Astrocytic Tau Pathologies in Argyrophilic Grain Disease and Related Four-repeat Tauopathies [Internet]. Vol. 72, *Acta Medica Okayama*. Okayama University Medical School; 2018 [cité 27 sept 2020]. p. 211-21.
30. Koga S, Parks A, Kasanuki K, Sanchez-Contreras M, Baker MC, Josephs KA, et al. Cognitive impairment in progressive supranuclear palsy is associated with tau burden. *Mov Disord*. 2017;32(12):1772-9.

31. Armstrong RA, Cairns NJ. Clustering and spatial correlations of the neuronal cytoplasmic inclusions, astrocytic plaques and ballooned neurons in corticobasal degeneration. *J Neural Transm.* 1 sept 2009;116(9):1103-10.
32. Cl M, R B, K B, Cc R, Ra S, JI C. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primer.* 15 oct 2015;1:15056-15056.
33. Williams DR, Holton JL, Strand C, Pittman A, de Silva R, Lees AJ, et al. Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain J Neurol.* juin 2007;130(Pt 6):1566-76.
34. Probst A, Tolnay M, Langui D, Goedert M, Spillantini MG. Pick's disease: hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment. *Acta Neuropathol (Berl).* déc 1996;92(6):588-96.
35. Hasegawa M, Smith MJ, Goedert M. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett.* 1998;437(3):207-10.
36. Nacharaju P, Lewis J, Easson C, Yen S, Hackett J, Hutton M, et al. Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett.* 1999;447(2-3):195-9.
37. Goedert M, Jakes R, Crowther RA. Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS Lett.* 1999;450(3):306-11.
38. Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015;41(1):24-46.
39. Falcon B, Noad J, McMahon H, Randow F, Goedert M. Galectin-8-mediated selective autophagy protects against seeded tau aggregation. *J Biol Chem.* 16 févr 2018;293(7):2438-51.
40. Furman JL, Holmes BB, Diamond MI. Sensitive Detection of Proteopathic Seeding Activity with FRET Flow Cytometry. *J Vis Exp JoVE.* 8 déc 2015;(106):e53205.
41. Jackson SJ, Kerridge C, Cooper J, Cavallini A, Falcon B, Cella CV, et al. Short Fibrils Constitute the Major Species of Seed-Competent Tau in the Brains of Mice Transgenic for Human P301S Tau. *J Neurosci.* 20 janv 2016;36(3):762-72.
42. Levarska L, Zilka N, Jadhav S, Neradil P, Novak M. Of Rodents and Men: The Mysterious Interneuronal Pilgrimage of Misfolded Protein Tau in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 1 janv 2013;37(3):569-77.
43. Wegmann S, Eftekharzadeh B, Tepper K, Zoltowska KM, Bennett RE, Dujardin S, et al. Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation. *EMBO J [Internet].* 3 avr 2018 [cité 23 sept 2020];37(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5881631/>
44. Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, et al. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun.* 10 oct 2013;4(1):2575.
45. Calafate S, Buist A, Miskiewicz K, Vijayan V, Daneels G, de Strooper B, et al. Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation. *Cell Rep.* 26 mai 2015;11(8):1176-83.
46. Castillo-Carranza DL, Gerson JE, Sengupta U, Guerrero-Muñoz MJ, Lasagna-Reeves CA, Kaye R. Specific Targeting of Tau Oligomers in Htau Mice Prevents Cognitive Impairment and Tau Toxicity

Following Injection with Brain-Derived Tau Oligomeric Seeds. *J Alzheimers Dis.* 1 janv 2014;40(s1):S97-111.

47. He Z, Guo JL, McBride JD, Narasimhan S, Kim H, Changolkar L, et al. Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat Med.* janv 2018;24(1):29-38.

48. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem.* 8 mai 2009;284(19):12845-52.

49. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* juill 2009;11(7):909-13.

50. Verny M, Duyckaerts C, Agid Y, Hauw JJ. The significance of cortical pathology in progressive supranuclear palsy. Clinico-pathological data in 10 cases. *Brain J Neurol.* août 1996;119 (Pt 4):1123-36.

51. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Tanaka N, Kakuta Y, et al. Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* sept 2004;63(9):911-8.

52. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl).* 1991;82(4):239-59.

53. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* mai 2012;71(5):362-81.

54. Irwin DJ, Brettschneider J, McMillan CT, Cooper F, Olm C, Arnold SE, et al. Deep clinical and neuropathological phenotyping of Pick disease. *Ann Neurol.* févr 2016;79(2):272-87.

55. Braak H, Del Tredici K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol (Berl).* 1 févr 2011;121(2):171-81.

56. Hoenig MC, Bischof GN, Seemiller J, Hammes J, Kukolja J, Onur ÖA, et al. Networks of tau distribution in Alzheimer's disease. *Brain.* 1 févr 2018;141(2):568-81.

57. Johnson KA, Schultz A, Betensky RA, Becker JA, Sepulcre J, Rentz D, et al. Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. *Ann Neurol.* janv 2016;79(1):110-9.

58. Schwarz AJ, Yu P, Miller BB, Shcherbinin S, Dickson J, Navitsky M, et al. Regional profiles of the candidate tau PET ligand 18F-AV-1451 recapitulate key features of Braak histopathological stages. *Brain J Neurol.* 2016;139(Pt 5):1539-50.

59. Sepulcre J, Grothe MJ, d'Oleire Uquillas F, Ortiz-Terán L, Diez I, Yang H-S, et al. Neurogenetic contributions to amyloid beta and tau spreading in the human cortex. *Nat Med.* déc 2018;24(12):1910-8.

60. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 9 avr 1982;216(4542):136-44.

61. Kretschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol.* janv 1986;122(1):1-5.

62. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell.* 1 août 1986;46(3):417-28.

63. Kazmirski SL, Alonso DO, Cohen FE, Prusiner SB, Daggett V. Theoretical studies of sequence effects on the conformational properties of a fragment of the prion protein: implications for scrapie formation. *Chem Biol.* mai 1995;2(5):305-15.
64. Zhang H, Kaneko K, Nguyen JT, Livshits TL, Baldwin MA, Cohen FE, et al. Conformational transitions in peptides containing two putative alpha-helices of the prion protein. *J Mol Biol.* 21 juill 1995;250(4):514-26.
65. Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem.* 1 sept 1988;176(1):21-30.
66. Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, et al. Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys.* oct 1989;274(1):1-13.
67. Nguyen JT, Inouye H, Baldwin MA, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB, et al. X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides. *J Mol Biol.* 29 sept 1995;252(4):412-22.
68. Bazan JF, Fletterick RJ, McKinley MP, Prusiner SB. Predicted secondary structure and membrane topology of the scrapie prion protein. *Protein Eng.* mars 1987;1(2):125-35.
69. Huang Z, Prusiner SB, Cohen FE. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des.* 1996;1(1):13-9.
70. Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, et al. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 mars 2002;99(6):3563-8.
71. Cobb NJ, Sönnichsen FD, McHaourab H, Surewicz WK. Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 nov 2007;104(48):18946-51.
72. Groveman BR, Dolan MA, Taubner LM, Kraus A, Wickner RB, Caughey B. Parallel in-register intermolecular β -sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem.* 29 août 2014;289(35):24129-42.
73. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature.* sept 2013;501(7465):45-51.
74. Fraser H, Dickinson AG. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol.* janv 1973;83(1):29-40.
75. Morales R, Abid K, Soto C. The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta.* juin 2007;1772(6):681-91.
76. Clavaguera F, Hench J, Goedert M, Tolnay M. Invited review: Prion-like transmission and spreading of tau pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1 févr 2015;41(1):47-58.
77. Clavaguera F, Akatsu H, Fraser G, Crowther RA, Frank S, Hench J, et al. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci.* 6 avr 2013;110(23):9535-40.
78. Kaufman SK, Sanders DW, Thomas TL, Ruchinkas AJ, Vaquer-Alicea J, Sharma AM, et al. Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability In Vivo. *Neuron.* 23 nov 2016;92(4):796-812.

79. Kaufman SK, Thomas TL, Del Tredici K, Braak H, Diamond MI. Characterization of tau prion seeding activity and strains from formaldehyde-fixed tissue. *Acta Neuropathol Commun.* 7 juin 2017;5(1):41.
80. Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, et al. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron.* 18 juin 2014;82(6):1271-88.
81. Clavaguera F, Duyckaerts C, Haïk S. Prion-like properties of Tau assemblies. *Curr Opin Neurobiol.* 2020;61:49-57.
82. Friedhoff P, Bergen M von, Mandelkow E-M, Davies P, Mandelkow E. A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci.* 22 déc 1998;95(26):15712-7.
83. Frost B, Ollesch J, Wille H, Diamond MI. Conformational Diversity of Wild-type Tau Fibrils Specified by Templated Conformation Change. *J Biol Chem.* 2 juin 2009;284(6):3546-51.
84. Götz JJ, Götz J. Experimental Models of Tauopathy – From Mechanisms to Therapies. In: Takashima A, Wolozin B, Buee L, éditeurs. *Tau Biology* [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [cité 16 déc 2020]. p. 381-91. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_28
85. Dujardin S, Colin M, Buée L. Invited review: Animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic. *Neuropathol Appl Neurobiol.* févr 2015;41(1):59-80.
86. Cubinková V, Valachová B, Brezováková V, Szabó R, Zimová I, Kostecká Z, et al. Next generation tau models in Alzheimer's disease research - virus based gene delivery systems. *Acta Virol.* 2017;61(1):13-21.
87. Ahmed Z, Cooper J, Murray TK, Garn K, McNaughton E, Clarke H, et al. A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: the pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathol (Berl).* mai 2014;127(5):667-83.
88. Gibbons GS, Banks RA, Kim B, Xu H, Changolkar L, Leight SN, et al. GFP-Mutant Human Tau Transgenic Mice Develop Tauopathy Following CNS Injections of Alzheimer's Brain-Derived Pathological Tau or Synthetic Mutant Human Tau Fibrils. *J Neurosci.* 22 nov 2017;37(47):11485-94.
89. Iba M, Guo JL, McBride JD, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 16 janv 2013;33(3):1024-37.
90. Iba M, McBride JD, Guo JL, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Tau pathology spread in PS19 tau transgenic mice following locus coeruleus (LC) injections of synthetic tau fibrils is determined by the LC's afferent and efferent connections. *Acta Neuropathol (Berl).* 1 sept 2015;130(3):349-62.
91. Kim D, Lim S, Haque MM, Ryoo N, Hong HS, Rhim H, et al. Identification of disulfide cross-linked tau dimer responsible for tau propagation. *Sci Rep.* 15 oct 2015;5(1):15231.
92. Peeraer E, Bottelbergs A, Van Kolen K, Stancu I-C, Vasconcelos B, Mahieu M, et al. Intracerebral injection of preformed synthetic tau fibrils initiates widespread tauopathy and neuronal loss in the brains of tau transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 1 janv 2015;73:83-95.

93. Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, et al. Distinct Tau Prion Strains Propagate in Cells and Mice and Define Different Tauopathies. *Neuron*. 18 juin 2014;82(6):1271-88.
94. Smolek T, Jadhav S, Brezovakova V, Cubinkova V, Valachova B, Novak P, et al. First-in-Rat Study of Human Alzheimer's Disease Tau Propagation. *Mol Neurobiol*. 1 janv 2019;56(1):621-31.
95. Stancu I-C, Vasconcelos B, Ris L, Wang P, Villers A, Peeraer E, et al. Templated misfolding of Tau by prion-like seeding along neuronal connections impairs neuronal network function and associated behavioral outcomes in Tau transgenic mice. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1 juin 2015;129(6):875-94.
96. de Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, et al. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron*. 23 févr 2012;73(4):685-97.
97. Narasimhan S, Guo JL, Changolkar L, Stieber A, McBride JD, Silva LV, et al. Pathological Tau Strains from Human Brains Recapitulate the Diversity of Tauopathies in Nontransgenic Mouse Brain. *J Neurosci*. 22 nov 2017;37(47):11406-23.
98. SantaCruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, et al. Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function. *Science*. 15 juill 2005;309(5733):476-81.
99. DeVos SL, Corjuc BT, Commins C, Dujardin S, Bannon RN, Corjuc D, et al. Tau reduction in the presence of amyloid- β prevents tau pathology and neuronal death in vivo. *Brain*. 1 juill 2018;141(7):2194-212.
100. Bennett RE, DeVos SL, Dujardin S, Corjuc B, Gor R, Gonzalez J, et al. Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid β . *Am J Pathol*. 1 juill 2017;187(7):1601-12.
101. Guo JL, Lee VM-Y. Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J Biol Chem*. 29 avr 2011;286(17):15317-31.
102. Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, Li M, Jacks R, Yanamandra K, et al. Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci*. 13 août 2013;110(33):E3138-47.
103. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded Aggregation and Toxicity of α -Synuclein and Tau CELLULAR MODELS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES. *J Biol Chem*. 11 mai 2010;285(45):34885-98.
104. Santa-Maria I, Varghese M, Książak-Reding H, Dzhun A, Wang J, Pasinetti GM. Paired Helical Filaments from Alzheimer Disease Brain Induce Intracellular Accumulation of Tau Protein in Aggresomes. *J Biol Chem*. 6 août 2012;287(24):20522-33.
105. Takahashi M, Miyata H, Kametani F, Nonaka T, Akiyama H, Hisanaga S, et al. Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1 juin 2015;129(6):895-907.
106. Varghese M, Santa-Maria I, Ho L, Ward L, Yemul S, Dubner L, et al. Extracellular Tau Paired Helical Filaments Differentially Affect Tau Pathogenic Mechanisms in Mitotic and Post-Mitotic Cells: Implications for Mechanisms of Tau Propagation in the Brain. *J Alzheimers Dis*. 1 janv 2016;54(2):477-96.

107. Woerman AL, Aoyagi A, Patel S, Kazmi SA, Lobach I, Grinberg LT, et al. Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci*. 13 déc 2016;113(50):E8187-96.
108. Nobuhara CK, DeVos SL, Commins C, Wegmann S, Moore BD, Roe AD, et al. Tau Antibody Targeting Pathological Species Blocks Neuronal Uptake and Interneuron Propagation of Tau in Vitro. *Am J Pathol*. juin 2017;187(6):1399-412.
109. Reilly P, Winston CN, Baron KR, Trejo M, Rockenstein EM, Akers JC, et al. Novel human neuronal tau model exhibiting neurofibrillary tangles and transcellular propagation. *Neurobiol Dis*. 1 oct 2017;106:222-34.
110. Takeda S, Wegmann S, Cho H, DeVos SL, Commins C, Roe AD, et al. Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nat Commun*. 13 oct 2015;6(1):8490.
111. Mirbaha H, Holmes BB, Sanders DW, Bieschke J, Diamond MI. Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation. *J Biol Chem*. 6 déc 2015;290(24):14893-903.
112. Mirbaha H, Chen D, Morazova OA, Ruff KM, Sharma AM, Liu X, et al. Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation. *Akhmanova A, éditeur. eLife*. 10 juill 2018;7:e36584.
113. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, et al. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2012;26(5):1946-59.
114. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Kiritoshi T, Neugebauer V, et al. Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci Rep*. 2012;2:700.
115. Kfoury N, Holmes BB, Jiang H, Holtzman DM, Diamond MI. Trans-cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species. *J Biol Chem*. 6 janv 2012;287(23):19440-51.
116. Yanamandra K, Kfoury N, Jiang H, Mahan TE, Ma S, Maloney SE, et al. Anti-Tau Antibodies that Block Tau Aggregate Seeding In Vitro Markedly Decrease Pathology and Improve Cognition In Vivo. *Neuron*. 16 oct 2013;80(2):402-14.
117. Dujardin S, Lécolle K, Caillierez R, Bégard S, Zommer N, Lachaud C, et al. Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2(1):14.
118. Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Krüger L, Irsen S, Tepper K, et al. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener*. 13 2017;12(1):5.
119. Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, Lachaud C, Carrier S, Lieger S, et al. Different tau species lead to heterogeneous tau pathology propagation and misfolding. *Acta Neuropathol Commun*. 29 2018;6(1):132.
120. Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, et al. Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One*. 2012;7(2):e31302.

121. Wegmann S, Maury EA, Kirk MJ, Saqran L, Roe A, DeVos SL, et al. Removing endogenous tau does not prevent tau propagation yet reduces its neurotoxicity. *EMBO J.* 14 déc 2015;34(24):3028-41.
122. Wegmann S, Bennett RE, Amaral AS, Hyman BT. Chapter 16 - Studying tau protein propagation and pathology in the mouse brain using adeno-associated viruses. In: Feinstein SC, LaPointe NE, éditeurs. *Methods in Cell Biology* [Internet]. Academic Press; 2017 [cité 19 sept 2020]. p. 307-22. (Methods in Tau Cell Biology; vol. 141).
123. Yu C-C, Jiang T, Yang A-F, Du Y-J, Wu M, Kong L-H. Epigenetic Modulation on Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease. *Neural Plast.* 2019;2019:6856327.
124. Kaufman SK, Del Tredici K, Thomas TL, Braak H, Diamond MI. Tau seeding activity begins in the transentorhinal/entorhinal regions and anticipates phospho-tau pathology in Alzheimer's disease and PART. *Acta Neuropathol (Berl).* 2018;136(1):57-67.
125. Saijo E, Metrick MA, Koga S, Parchi P, Litvan I, Spina S, et al. 4-Repeat tau seeds and templating subtypes as brain and CSF biomarkers of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol (Berl).* 2020;139(1):63-77.
126. Saijo E, Ghetti B, Zanusso G, Oblak A, Furman JL, Diamond MI, et al. Ultrasensitive and selective detection of 3-repeat tau seeding activity in Pick disease brain and cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol (Berl).* 1 mai 2017;133(5):751-65.
127. Kraus A, Saijo E, Metrick MA, Newell K, Sigurdson CJ, Zanusso G, et al. Seeding selectivity and ultrasensitive detection of tau aggregate conformers of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 2019;137(4):585-98.
128. Holmes BB, Furman JL, Mahan TE, Yamasaki TR, Mirbaha H, Eades WC, et al. Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 oct 2014;111(41):E4376-4385.
129. Takeda S, Commins C, DeVos SL, Nobuhara CK, Wegmann S, Roe AD, et al. Seed-competent high-molecular-weight tau species accumulates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease mouse model and human patients. *Ann Neurol.* 2016;80(3):355-67.
130. Polanco JC, Scicluna BJ, Hill AF, Götz J. Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner. *J Biol Chem.* 10 juin 2016;291(24):12445-66.
131. Brandel J-P, Culeux A, Grznarova K, Levavasseur E, Lamy P, Privat N, et al. Amplification techniques and diagnosis of prion diseases. *Rev Neurol (Paris).* oct 2019;175(7-8):458-63.
132. Castilla J, Gonzalez-Romero D, Saá P, Morales R, De Castro J, Soto C. Crossing the Species Barrier by PrPSc Replication In Vitro Generates Unique Infectious Prions. *Cell.* 5 sept 2008;134(5):757-68.
133. Weber P, Giese A, Piening N, Mitteregger G, Thomzig A, Beekes M, et al. Generation of genuine prion infectivity by serial PMCA. *Vet Microbiol.* 31 août 2007;123(4):346-57.
134. Collinge J. Mammalian prions and their wider relevance in neurodegenerative diseases. *Nature.* nov 2016;539(7628):217-26.
135. Yamada K, Holth JK, Liao F, Stewart FR, Mahan TE, Jiang H, et al. Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *J Exp Med.* 10 mars 2014;211(3):387-93.

136. Pooler AM, Phillips EC, Lau DHW, Noble W, Hanger DP. Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep.* 1 avr 2013;14(4):389-94.
137. Wu JW, Hussaini SA, Bastille IM, Rodriguez GA, Mrejeru A, Rilett K, et al. Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nat Neurosci.* 2016;19(8):1085-92.
138. Bakker A, Krauss GL, Albert MS, Speck CL, Jones LR, Stark CE, et al. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron.* 10 mai 2012;74(3):467-74.
139. Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold K-H, Haass C, et al. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science.* 19 sept 2008;321(5896):1686-9.
140. Busche MA, Chen X, Henning HA, Reichwald J, Staufenbiel M, Sakmann B, et al. Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci.* 29 mai 2012;109(22):8740-5.
141. Mohamed N-V, Desjardins A, Leclerc N. Tau secretion is correlated to an increase of Golgi dynamics. *PLOS ONE.* 26 mai 2017;12(5):e0178288.
142. Mohamed N-V, Plouffe V, Rémillard-Labrosse G, Planel E, Leclerc N. Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons. *Sci Rep.* 17 juill 2014;4:5715.
143. Plouffe V, Mohamed N-V, Rivest-McGraw J, Bertrand J, Lauzon M, Leclerc N. Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PloS One.* 2012;7(5):e36873.
144. Kanmert D, Cantlon A, Muratore CR, Jin M, O'Malley TT, Lee G, et al. C-Terminally Truncated Forms of Tau, But Not Full-Length Tau or Its C-Terminal Fragments, Are Released from Neurons Independently of Cell Death. *J Neurosci.* 29 juill 2015;35(30):10851-65.
145. Sayas CL, Medina M, Cuadros R, Ollá I, García E, Pérez M, et al. Role of tau N-terminal motif in the secretion of human tau by End Binding proteins. *PLOS ONE.* 22 janv 2019;14(1):e0210864.
146. Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I. Axonal Tau mRNA Localization Coincides with Tau Protein in Living Neuronal Cells and Depends on Axonal Targeting Signal. *J Neurosci.* 1 sept 2001;21(17):6577-87.
147. Litman P, Barg J, Rindzoonski L, Ginzburg I. Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron.* avr 1993;10(4):627-38.
148. Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, et al. Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PloS One.* 2014;9(6):e100760.
149. Katsinelos T, Zeitler M, Dimou E, Karakatsani A, Müller H-M, Nachman E, et al. Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Rep.* 15 2018;23(7):2039-55.
150. Fontaine SN, Zheng D, Sabbagh JJ, Martin MD, Chaput D, Darling A, et al. DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *EMBO J.* 15 juill 2016;35(14):1537-49.
151. Yan X, Nykänen N-P, Brunello CA, Haapasalo A, Hiltunen M, Uronen R-L, et al. FRMD4A-cytohesin signaling modulates the cellular release of tau. *J Cell Sci.* 15 2016;129(10):2003-15.

152. Merezko M, Brunello CA, Yan X, Vihinen H, Jokitalo E, Uronen R-L, et al. Secretion of Tau via an Unconventional Non-vesicular Mechanism. *Cell Rep.* 20 2018;25(8):2027-2035.e4.
153. Lee J, Ye Y. The Roles of Endo-Lysosomes in Unconventional Protein Secretion. *Cells* [Internet]. 3 nov 2018 [cité 27 sept 2020];7(11).
154. Rodriguez L, Mohamed N-V, Desjardins A, Lippé R, Fon EA, Leclerc N. Rab7A regulates tau secretion. *J Neurochem.* 2017;141(4):592-605.
155. Tang Z, Iojia E, Bereczki E, Hultenby K, Li C, Guan Z, et al. mTor mediates tau localization and secretion: Implication for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 juill 2015;1853(7):1646-57.
156. Kang S, Son SM, Baik SH, Yang J, Mook-Jung I. Autophagy-Mediated Secretory Pathway is Responsible for Both Normal and Pathological Tau in Neurons. *J Alzheimers Dis JAD.* 2019;70(3):667-80.
157. Tian T, Zhu Y-L, Hu F-H, Wang Y-Y, Huang N-P, Xiao Z-D. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol.* 2013;228(7):1487-95.
158. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 10 déc 2015;219:278-94.
159. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, et al. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci.* 29 juin 2004;101(26):9683-8.
160. Rajendran L, Bali J, Barr MM, Court FA, Krämer-Albers E-M, Picou F, et al. Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 12 nov 2014;34(46):15482-9.
161. Lee H-J, Patel S, Lee S-J. Intravesicular Localization and Exocytosis of α -Synuclein and its Aggregates. *J Neurosci.* 22 juin 2005;25(25):6016-24.
162. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhai S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* avr 2011;29(4):341-5.
163. Spitzer P, Mulzer L-M, Oberstein TJ, Munoz LE, Lewczuk P, Kornhuber J, et al. Microvesicles from cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease display reduced concentrations of tau and APP protein. *Sci Rep* [Internet]. 8 mai 2019 [cité 27 sept 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6506501/>
164. Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Saman S, et al. Exosome-associated Tau Is Secreted in Tauopathy Models and Is Selectively Phosphorylated in Cerebrospinal Fluid in Early Alzheimer Disease. *J Biol Chem.* 2 mars 2012;287(6):3842-9.
165. Saman S, Lee NCY, Inoyo I, Jin J, Li Z, Doyle T, et al. Proteins recruited to exosomes by tau overexpression implicate novel cellular mechanisms linking tau secretion with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD.* 2014;40 Suppl 1:S47-70.
166. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci.* nov 2015;18(11):1584-93.
167. Winston CN, Goetzl EJ, Akers JC, Carter BS, Rockenstein EM, Galasko D, et al. Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimers Dement Amst Neth.* 2016;3:63-72.

168. Sokolow S, Henkins KM, Bilousova T, Gonzalez B, Vinters HV, Miller CA, et al. Pre-synaptic C-terminal truncated tau is released from cortical synapses in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2015;133(3):368-79.
169. Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* juin 2015;11(6):600-607.e1.
170. Abner EL, Elahi FM, Jicha GA, Mustapic M, Al-Janabi O, Kramer JH, et al. Endothelial-derived plasma exosome proteins in Alzheimer's disease angiopathy. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* avr 2020;34(4):5967-74.
171. Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, et al. Small Misfolded Tau Species Are Internalized via Bulk Endocytosis and Anterogradely and Retrogradely Transported in Neurons. *J Biol Chem.* 18 janv 2013;288(3):1856-70.
172. Usenovic M, Niroomand S, Drolet RE, Yao L, Gaspar RC, Hatcher NG, et al. Internalized Tau Oligomers Cause Neurodegeneration by Inducing Accumulation of Pathogenic Tau in Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *J Neurosci.* 21 oct 2015;35(42):14234-50.
173. Rauch JN, Chen JJ, Sorum AW, Miller GM, Sharf T, See SK, et al. Tau Internalization is Regulated by 6-O Sulfation on Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs). *Sci Rep.* 23 avr 2018;8(1):6382.
174. Stopschinski BE, Holmes BB, Miller GM, Manon VA, Vaquer-Alicea J, Prueitt WL, et al. Specific glycosaminoglycan chain length and sulfation patterns are required for cell uptake of tau versus α -synuclein and β -amyloid aggregates. *J Biol Chem.* 7 juin 2018;293(27):10826-40.
175. Rauch JN, Luna G, Guzman E, Audouard M, Challis C, Sibih YE, et al. LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. *Nature.* avr 2020;580(7803):381-5.
176. Evans LD, Wassmer T, Fraser G, Smith J, Perkinton M, Billinton A, et al. Extracellular Monomeric and Aggregated Tau Efficiently Enter Human Neurons through Overlapping but Distinct Pathways. *Cell Rep.* 27 mars 2018;22(13):3612-24.
177. Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Rubio A, Díaz-Hernández JI, Miras-Portugal MT, Avila J. Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol.* oct 2009;19(10):708-17.
178. Calafate S, Flavin W, Verstreken P, Moechars D. Loss of Bin1 Promotes the Propagation of Tau Pathology. *Cell Rep.* 18 oct 2016;17(4):931-40.
179. Michel CH, Kumar S, Pinotsi D, Tunnacliffe A, George-Hyslop PS, Mandelkow E, et al. Extracellular Monomeric Tau Protein Is Sufficient to Initiate the Spread of Tau Protein Pathology. *J Biol Chem.* 1 oct 2014;289(2):956-67.
180. Lambert J-C, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* déc 2013;45(12):1452-8.
181. Ando K, Tomimura K, Sazdovitch V, Suain V, Yilmaz Z, Authélet M, et al. Level of PICALM, a key component of clathrin-mediated endocytosis, is correlated with levels of phosphotau and autophagy-related proteins and is associated with tau inclusions in AD, PSP and Pick disease. *Neurobiol Dis.* 31 mai 2016;94:32-43.

182. Tardivel M, Bégard S, Bousset L, Dujardin S, Coens A, Melki R, et al. Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathol Commun.* 4 nov 2016;4(1):117.
183. Abounit S, Wu JW, Duff K, Victoria GS, Zurzolo C. Tunneling nanotubes: A possible highway in the spreading of tau and other prion-like proteins in neurodegenerative diseases. *Prion.* 02 2016;10(5):344-51.
184. Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A, Browman DT, et al. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol.* mars 2009;11(3):328-36.
185. Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Köhler K, et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol.* févr 2008;10(2):211-9.
186. Nawaz M, Fatima F. Extracellular Vesicles, Tunneling Nanotubes, and Cellular Interplay: Synergies and Missing Links. *Front Mol Biosci.* 2017;4:50.
187. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* 1 janv 2018;98(1):239-389.
188. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* juin 2002;200(6):629-38.
189. Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A. Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet.* janv 2001;27(1):117-20.
190. Sosunov AA, Guilfoyle E, Wu X, McKhann GM, Goldman JE. Phenotypic conversions of « protoplasmic » to « reactive » astrocytes in Alexander disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 24 avr 2013;33(17):7439-50.
191. Park S-Y, Kim I-S. Engulfment signals and the phagocytic machinery for apoptotic cell clearance. *Exp Mol Med.* mai 2017;49(5):e331-e331.
192. Iram T, Ramirez-Ortiz Z, Byrne MH, Coleman UA, Kingery ND, Means TK, et al. Megf10 Is a Receptor for C1Q That Mediates Clearance of Apoptotic Cells by Astrocytes. *J Neurosci.* 11 mai 2016;36(19):5185-92.
193. Tasdemir-Yilmaz OE, Freeman MR. Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes Dev.* 1 janv 2014;28(1):20-33.
194. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. *Glia.* 2010;58(9):1094-103.
195. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci Transl Med.* 15 août 2012;4(147):147ra111-147ra111.
196. Iliff JJ, Chen MJ, Plog BA, Zeppenfeld DM, Soltero M, Yang L, et al. Impairment of Glymphatic Pathway Function Promotes Tau Pathology after Traumatic Brain Injury. *J Neurosci.* 3 déc 2014;34(49):16180-93.
197. Eide PK, Vatnehol SAS, Emblem KE, Ringstad G. Magnetic resonance imaging provides evidence of glymphatic drainage from human brain to cervical lymph nodes. *Sci Rep.* 8 mai 2018;8(1):1-10.

198. Nishimura M, Namba Y, Ikeda K, Oda M. Glial fibrillary tangles with straight tubules in the brains of patients with progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett.* 31 août 1992;143(1-2):35-8.
199. Komori T. Tau-positive glial inclusions in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease. *Brain Pathol Zurich Switz.* oct 1999;9(4):663-79.
200. Feany MB, Dickson DW. Widespread cytoskeletal pathology characterizes corticobasal degeneration. *Am J Pathol.* juin 1995;146(6):1388-96.
201. Richetin K, Steullet P, Pachoud M, Perbet R, Parietti E, Mahewaran M, et al. Tau accumulation in astrocytes of the dentate gyrus induces neuronal dysfunction and memory deficits in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience.* 2020;
202. Götz J, Tolnay M, Barmettler R, Chen F, Probst A, Nitsch RM. Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. *Eur J Neurosci.* juin 2001;13(11):2131-40.
203. Lin W-L, Lewis J, Yen S-H, Hutton M, Dickson DW. Filamentous Tau in Oligodendrocytes and Astrocytes of Transgenic Mice Expressing the Human Tau Isoform with the P301L Mutation. *Am J Pathol.* janv 2003;162(1):213-8.
204. Higuchi M, Ishihara T, Zhang B, Hong M, Andreadis A, Trojanowski JQ, et al. Transgenic Mouse Model of Tauopathies with Glial Pathology and Nervous System Degeneration. *Neuron.* 1 août 2002;35(3):433-46.
205. Forman MS, Lal D, Zhang B, Dabir DV, Swanson E, Lee VM-Y, et al. Transgenic Mouse Model of Tau Pathology in Astrocytes Leading to Nervous System Degeneration. *J Neurosci.* 4 juin 2005;25(14):3539-50.
206. Piacentini R, Puma DDL, Mainardi M, Lazzarino G, Tavazzi B, Arancio O, et al. Reduced gliotransmitter release from astrocytes mediates tau-induced synaptic dysfunction in cultured hippocampal neurons. *Glia.* 2017;65(8):1302-16.
207. Lee H-J, Suk J-E, Patrick C, Bae E-J, Cho J-H, Rho S, et al. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem.* 19 mars 2010;285(12):9262-72.
208. Fernagut P-O, Tison F. Animal models of multiple system atrophy. *Neuroscience.* 1 juin 2012;211:77-82.
209. Yazawa I, Giasson BI, Sasaki R, Zhang B, Joyce S, Uryu K, et al. Mouse model of multiple system atrophy alpha-synuclein expression in oligodendrocytes causes glial and neuronal degeneration. *Neuron.* 24 mars 2005;45(6):847-59.
210. Reyes JF, Rey NL, Bousset L, Melki R, Brundin P, Angot E. Alpha-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. *Glia.* 1 mars 2014;62(3):387-98.
211. Hollister JR, Lee KS, Dorward DW, Baron GS. Efficient Uptake and Dissemination of Scrapie Prion Protein by Astrocytes and Fibroblasts from Adult Hamster Brain. *PLoS ONE* [Internet]. 30 janv 2015
212. Narasimhan S, Changolkar L, Riddle DM, Kats A, Stieber A, Weitzman SA, et al. Human tau pathology transmits glial tau aggregates in the absence of neuronal tau. *J Exp Med.* 03 2020;217(2).

213. Martini-Stoica H, Cole AL, Swartzlander DB, Chen F, Wan Y-W, Bajaj L, et al. TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *J Exp Med*. 3 sept 2018;215(9):2355-77.
214. Goetzl EJ, Mustapic M, Kapogiannis D, Eitan E, Lobach IV, Goetzl L, et al. Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2016;30(11):3853-9.
215. Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L, Hoffmann R, Davies P. A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. nov 1997;69(5):2087-95.
216. Jeganathan S, Hascher A, Chinnathambi S, Biernat J, Mandelkow E-M, Mandelkow E. 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*. 14 nov 2008;283(46):32066-76.
217. Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion J-P, Hamdane M, et al. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol*. août 2006;169(2):599-616.
218. Leroy K, Bretteville A, Schindowski K, Gilissen E, Authélet M, De Decker R, et al. Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *Am J Pathol*. sept 2007;171(3):976-92.
219. Reiserer RS, Harrison FE, Syverud DC, McDonald MP. Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1DeltaE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav*. févr 2007;6(1):54-65.
220. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*
221. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.
222. Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res*. 08 2019;47(D1):D516-9.
223. Böing AN, Pol E van der, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*. 1 janv 2014;3(1):23430.
224. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. avr 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
225. Albert M, Mairet-Coello G, Danis C, Lieger S, Caillierez R, Carrier S, et al. Prevention of tau seeding and propagation by immunotherapy with a central tau epitope antibody. *Brain J Neurol*. 1 juin 2019;142(6):1736-50.
226. Simón D, García-García E, Royo F, Falcón-Pérez JM, Avila J. Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett*. 2012;586(1):47-54.

227. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*. 20 août 2001;310(2):173-86.
228. Yang S-Y, Chiu M-J, Chen T-F, Horng H-E. Detection of Plasma Biomarkers Using Immunomagnetic Reduction: A Promising Method for the Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neurol Ther*. 21 juill 2017;6(Suppl 1):37-56.
229. Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Sakai K, Yamada M. Serum tau protein as a marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol*. 1 août 2011;258(8):1464-8.
230. Wunderlich MT, Lins H, Skalej M, Wallesch C-W, Goertler M. Neuron-specific enolase and tau protein as neurobiochemical markers of neuronal damage are related to early clinical course and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 1 sept 2006;108(6):558-63.
231. Liliang P-C, Liang C-L, Weng H-C, Lu K, Wang K-W, Chen H-J, et al. Tau proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *J Surg Res*. 15 mai 2010;160(2):302-7.
232. Foiani MS, Woollacott IO, Heller C, Bocchetta M, Heslegrave A, Dick KM, et al. Plasma tau is increased in frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(8):804-7.
233. Jia L, Qiu Q, Zhang H, Chu L, Du Y, Zhang J, et al. Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc*. 2019;15(8):1071-80.
234. Goetzl EJ, Elahi FM, Mustapic M, Kapogiannis D, Pryhoda M, Gilmore A, et al. Altered levels of plasma neuron-derived exosomes and their cargo proteins characterize acute and chronic mild traumatic brain injury. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2019;33(4):5082-8.
235. Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Krämer-Albers E-M. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 30 oct 2013 [cité 18 févr 2015];7. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812991/>
236. Christodoulou I, Patsali P, Stephanou C, Antoniou M, Kleanthous M, Lederer CW. Measurement of lentiviral vector titre and copy number by cross-species duplex quantitative PCR. *Gene Ther*. janv 2016;23(1):113-8.
237. Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci*. 1 avr 2006;31(4):642-8.
238. Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol*. juill 2013;11(7):e1001604.
239. Morel L, Regan M, Higashimori H, Ng SK, Esau C, Vidensky S, et al. Neuronal Exosomal miRNA-dependent Translational Regulation of Astroglial Glutamate Transporter GLT1. *J Biol Chem*. 8 mars 2013;288(10):7105-16.
240. Rebeck GW, Hyman BT. Neuroanatomical connections and specific regional vulnerability in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1 janv 1993;14(1):45-7.
241. Kaufman SK, Del Tredici K, Thomas TL, Braak H, Diamond MI. Tau seeding activity begins in the transentorhinal/entorhinal regions and anticipates phospho-tau pathology in Alzheimer's disease and PART. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018;136(1):57-67.

242. Hyman BT, Hoesen GV, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 14 sept 1984;225(4667):1168-70.
243. Kubo A, Misonou H, Matsuyama M, Nomori A, Wada-Kakuda S, Takashima A, et al. Distribution of endogenous normal tau in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 01 2019;527(5):985-98.
244. Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, et al. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*. 22 déc 2010;68(6):1067-81.
245. Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, Eersel J van, et al. Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell*. 6 août 2010;142(3):387-97.
246. Dujardin S, Commins C, Lathuiliere A, Beerepoot P, Fernandes AR, Kamath TV, et al. Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2020;26(8):1256-63.
247. Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*. 1 mai 2014;11(1):10.
248. Bering EA. Cerebrospinal fluid production and its relationship to cerebral metabolism and cerebral blood flow. *Am J Physiol-Leg Content*. 1 oct 1959;197(4):825-8.
249. Pollay M, Curl F. Secretion of cerebrospinal fluid by the ventricular ependyma of the rabbit. *Am J Physiol*. oct 1967;213(4):1031-8.
250. Lun MP, Monuki ES, Lehtinen MK. Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci*. août 2015;16(8):445-57.
251. Serot J-M, Béné M-C, Faure GC. Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Front Biosci J Virtual Libr*. 1 mai 2003;8:s515-521.
252. Iliff JJ, Chen MJ, Plog BA, Zeppenfeld DM, Soltero M, Yang L, et al. Impairment of Glymphatic Pathway Function Promotes Tau Pathology after Traumatic Brain Injury. *J Neurosci*. 3 déc 2014;34(49):16180-93.
253. Winston CN, Goetzl EJ, Akers JC, Carter BS, Rockenstein EM, Galasko D, et al. Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimers Dement Amst Neth*. 2016;3:63-72.
254. Goetzl EJ, Peltz CB, Mustapic M, Kapogiannis D, Yaffe K. Neuron-Derived Plasma Exosome Proteins after Remote Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 15 2020;37(2):382-8.
255. Mukaetova-Ladinska EB, Abdell-All Z, Andrade J, da Silva JA, Boksha I, Burbaeva G, et al. Platelet Tau Protein as a Potential Peripheral Biomarker in Alzheimer's Disease: An Explorative Study. *Curr Alzheimer Res*. 2018;15(9):800-8.
256. MacGillavry HD, Hoogenraad CC. The internal architecture of dendritic spines revealed by super-resolution imaging: What did we learn so far? *Exp Cell Res*. 5 mars 2015;
257. Martini-Stoica H, Cole AL, Swartzlander DB, Chen F, Wan Y-W, Bajaj L, et al. TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *J Exp Med*. 3 sept 2018;215(9):2355-77.

258. Stefanis L, Emmanouilidou E, Pantazopoulou M, Kirik D, Vekrellis K, Tofaris GK. How is alpha-synuclein cleared from the cell? *J Neurochem*. 2019;150(5):577-90.
259. Wang Y, Martinez-Vicente M, Krüger U, Kaushik S, Wong E, Mandelkow E-M, et al. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet*. 1 nov 2009;18(21):4153-70.
260. Frake RA, Ricketts T, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy and neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2 janv 2015;125(1):65-74.
261. Rubinsztein DC. Cell biology: Receptors for selective recycling. *Nature*. 3 juin 2015;
262. Menzies FM, Fleming A, Rubinsztein DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. juin 2015;16(6):345-57.
263. Lee MJ, Lee JH, Rubinsztein DC. Tau degradation: the ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Prog Neurobiol*. juin 2013;105:49-59.
264. Sica RE. Could astrocytes be the primary target of an offending agent causing the primary degenerative diseases of the human central nervous system? A hypothesis. *Med Hypotheses*. mai 2015;84(5):481-9.
265. Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev*. mai 2010;63(1-2):189-211.
266. Verkhratsky A, Olanbarria M, Noristani HN, Yeh C-Y, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. oct 2010;7(4):399-412.