

Université de Lille
École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THÈSE

Présentée par

Elodie LEROUX

Pour l'obtention du grade de

DOCTEURE DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Spécialité : Neurosciences

**Vésicules extracellulaires : actrices de la
propagation de la pathologie tau dans les
tauopathies**

Soutenue publiquement le 24 septembre 2021 devant le jury composé de :

Mme. la Dr. Clotilde THÉRY	Présidente du jury
Mme. la Dr. Marie-Claude POTIER	Rapportrice
M. le Dr. Mehdi KABANI	Rapporteur
M. le Pr. Christophe HIRTZ	Examineur
M. le Dr. Luc BUÉE	Examineur
Mme. la Dr. Morvane COLIN	Directrice de thèse

Aux patients,
À leurs proches,
Aux soignants et aidants,

REMERCIEMENTS

Merci à toi, cher **lecteur** ! Ta curiosité ou ton intérêt pour le sujet t'a mené jusqu'ici et j'espère que ce travail t'inspirera ou t'apportera les informations que tu recherches.

Merci à la région **Hauts-de-France** et à l'**INSERM** pour avoir financé mes trois années de thèse.

Merci au **Dr. Marie-Claude Potier** et au **Dr. Mehdi Kabani** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail. Merci également au **Dr. Clothilde Théry** et au **Pr. Christophe Hirtz** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs. Merci aussi au **Dr. Guillaume Van Niel** et une nouvelle fois au **Dr. Marie-Claude Potier** pour avoir été pleins de bons conseils lors de mes comités de suivi de thèse.

Et puisqu'une thèse est aussi et surtout un travail d'**équipe**, je tiens à profiter de ces quelques pages pour remercier chaque personne qui, de près ou de loin, a contribué à ce travail. C'est donc avec plaisir, émotion et une pointe de nostalgie que j'écris ces lignes.

Merci **Luc** de m'avoir accueillie dans les traditions du Nord, *chaleureusement et avec une triple Karmeliet*, dans votre équipe « Alzheimer & Tauopathies » au sein du centre LiNCog. Merci pour tous vos bons conseils, vos idées, votre réflexion, vos questions, votre expérience et votre expertise qui ont fait avancer ce projet. Merci d'avoir toujours été à l'écoute et d'avoir laissé la porte de votre bureau ouverte malgré la montagne de choses que vous avez à gérer. Cela a donné lieu à de longues discussions toujours très intéressantes qu'il s'agisse de science, de l'équipe, de l'avenir ou de tout autre chose. Vos retours d'expériences m'ont permis d'avancer dans mon projet.

Merci **Morvane** pour tout le temps et l'énergie que tu as mis dans l'encadrement de ma thèse. Merci pour ta disponibilité, ta réactivité, ton empathie et tes idées débordantes. Merci aussi de m'avoir laissé suffisamment d'autonomie pour mener à bien cette thèse et me permettre de devenir une chercheuse à part entière. Merci d'avoir pris en compte mes idées, mes réflexions, merci d'avoir laissé la place à l'échange et de m'avoir fait confiance ! Nous sommes la preuve que la Bretagne et la Normandie peuvent s'allier pour accomplir de beaux projets ! D'autant plus qu'arrivées à la fin de ces 3 années, nous nous supportons encore : c'est donc le signe que c'est une affaire qui roule ;) Alors à quand le fameux carton de champagne ?

Merci aussi à tous nos collaborateurs sans qui nos projets n'avanceraient pas autant. Merci à **Sylvain Lehmann** et son équipe, notamment **Christophe Hirtz**, **Laura Fichter** et **Jérôme Vialaret** ainsi qu'à **Lisa Morichon** et **Laurent Tiers**. Merci également à l'équipe PRISM et notamment à **Christophe Lefebvre** et **Soulaimane Aboulouard**. Merci aussi à **Kévin Richetin** installé à Lausanne. J'ai adoré développer ou poursuivre des collaborations avec vous, c'est toujours très enrichissant de sortir la tête du labo pour s'ouvrir à ce qui se fait ailleurs.

Merci aux PI de l'équipe pour vos conseils scientifiques, votre sympathie à mon égard et votre humour : **Bruno, Nicolas, Valérie, David, Malika, Didier, Bernard, Sophie, Marie, Susanna, Vincent, Thibaud, Vincent et Claire-Marie**.

Merci aussi à toutes les personnes impliquées directement dans les manip de ce projet :

Merci **Sarah** (alias ma deuxième sœur jumelle). Tu as été la première avec qui j'ai travaillé et, dès mon arrivée, tu m'as permis de me sentir bien dans l'équipe. Dédicaces à toutes les gouttes

que nous avons comptées en chantant des chansons parfois douteuses, en parlant de tout et de rien, mais surtout de tout ;) Tu m'as tout appris. Tu es un p'tit bout de femme exceptionnelle, d'une extrême gentillesse et bienveillance mais aussi une complice toujours partante pour un (des) p'tit(s) coup(s) au UNO's et tout un tas d'autres choses. Loin des yeux mais près du cœur, tu as été, tu es et tu resteras une amie pour moi ! « OK Sarah, à très vite pour de nouvelles virées exotiques ! ».

Merci **Romain** ! Ce travail n'aurait pas été possible sans le lien que tu fais entre la recherche fondamentale et l'hôpital et je pense que c'est d'une grande importance. C'est aussi grâce à toi que j'ai pu voir un cerveau en vrai de vrai (et d'autres trucs dégueu dont je me serais bien passée). Tes idées farfelues nous manquent déjà, reviens vite dans l'équipe ! Et moi, j'espère pouvoir venir boire une BONNE bière dans ton bar un jour.

Merci **Raph** pour m'avoir évité la mort à de multiples reprises en terrain hostile entourée de créatures obscures et sombres. Tu m'as secourue de l'enfer, tu m'as évité les arrêts cardiaques et tu m'as empêchée de me faire manger toute crue, et puis, c'était (assez) chouette finalement de faire de la couture en discutant de tout et de rien avec toi ! Merci aussi pour tes réponses à mes nombreuses questions. Merci de m'avoir filé des coups de main tout au long de ces années, de m'avoir appris plein de choses. Je te souhaite plein de bonheur dans ta nouvelle maison !

YoyoyoyoyoyoYO, YoyoyoyoyoyoYOOOO ! Merci à toi qui est là depuis le début de ma thèse et qui n'a plus le droit de partir avant que je parte aussi. Oui, parce que le labo sans toi, ça ne serait pas le fun tous les jours et puis tu es le seul à parler le même langage que moi ;) Sans toi, il n'y aurait pas eu les tonnes de blagues, les burgers, le bonnet merde, Kung Fu Panda, les karaokés pendant les purifs (tu sais apprécier mes talents, merci !), le Zomombieeee, LE barbecue (au passage, j'espère revoir Callie avant ses 18 ans), et j'en passe... Tu es, tu es... ? (C'est la devinette du jour) Tu es **MON Thomas** ! C'est sûrement toi qui devrais me remercier de t'avoir supporté mais je vais quand même te dire MERCIIII pour tous nos bons moments et notre complicité qui fait de nous une team de choc ! Merci de m'avoir soutenue et aidée pendant ces 3 années (*les commandes = mon pire cauchemar*). Je te souhaite le meilleur, à toi et ta petite famille ☺

Merci **Anne** pour m'avoir redonné le sourire plus d'une fois en microscopie et t'être émerveillée avec moi devant tout plein de belles petites vésicules. Profite bien de la retraite !

Merci à mes stagiaires, **Camille & Florent**, que j'ai eu la chance d'encadrer. Vous m'avez permis d'améliorer ma pédagogie (du moins, je l'espère) et de réviser mes classiques. Vous m'avez aussi bien avancée sur mes projets donc merci pour votre aide et votre implication.

Enfin, merci aux autres.

(Non je plaisante, ça ne pouvait pas s'arrêter là !)

Merci **Marine**, c'est ma copiiiiinnneeeeeeeee ! Mon alliée n°1 dans cette thèse et dans ma vie lilloise, mais aussi une amie pour la vie ! On a vécu et partagé ensemble 3 années de montagnes russes émotionnelles et tu m'as grandement aidée à tenir le coup à moult reprises ne serait-ce que par ton oreille attentive. Au-delà de ça, tu m'as sauvée d'une invasion de souris, mais tu as aussi fortement contribué à pourrir mon appartement, tu as presque réussi à me faire devenir une FIT JEAN voire une moine Shaolin et on a finalement fini par monter une boîte de FIT'ess ensemble ;) Bref, MERCI pour toutes les sorties, tous les apéros, les restos, les week-ends, les potins... La liste est bien trop longue pour tout évoquer mais c'est écrit, là, dans un coin de ma tête ! Quoi qu'il en soit, merci d'avoir été toi et d'avoir été là ! Bon courage pour ta fin de thèse paupiette, tiens le coup (mais je serai là !), et sinon on se retrouve en Asie (#spoileralert !!!).

Merci aux CDIsés du labo sans qui tout se perdrait. Merci **Sabiha**, notre maman à tous, une personne d'une gentillesse incroyable dont chaque équipe aurait besoin ! Merci d'avoir répondu à mes 12 658 questions et d'avoir toujours pris le temps alors que tu étais déjà bien prise par celui-ci. Merci **Sév, Thomas C., Seb** et **Emilie** pour avoir répondu à mes 12 658 autres questions. C'est chouette de vous avoir à nos côtés et de papoter avec vous ! ☺

Merci aux compagnons de galère et au soutien des WE, j'ai nommé : les **thésards** !!! Merci aux anciens : **Clément** toujours décontracté, rassurant et présent pour répondre à mes questions ou filer un coup de main dès mon arrivée, **Mégane**, parce qu'on aura bien rigolé aux soirées Halloween et à la zombie run, et **Kévin**, peut-être pas pour m'avoir fait peur un paquet de fois ni pour toutes les photos que tu as prises à mon insu mais pour tous nos échanges et parce que tu étais un peu devenu le papa du labo ;) Merci aussi à **Sarah**, tu es la crème de la crème, j'ai adoré avoir de longues conversations avec toi et je n'oublierai pas ton talent fou pour ta recette des bouchées de Noël ! Merci aussi à la team « D1 » : **Marie** pour les moments off : ceux au bar où tu as succombé aux vices du Nord et ceux à se défouler sur des trampo' ou à jeter des haches, **Thomas R.** au top du relativisme et une vraie pipelette pleine de paroles sages, et **Marine** (oui je te recale encore là, ahah). Merci **Sarra**, la best prof de stretching qui a supporté mes blagues et qui est tombée dans le panneau bien souvent, ahah. Merci aussi à **Hamza** car tu explodes les scores de gentillesse et c'est très agréable au quotidien. Merci aussi à **Georgia** pour son optimisme débordant et à **Mélanie** pour sa réactivité et son enthousiasme ; le lien avec l'hôpital est pour moi très important et nous avons besoin de gens comme toi. Enfin, bon courage à la nouvelle génération : **Ilda, Thibault** et bientôt **Agathe** ☺

Merci aussi aux post-docs, ingés ou AI qui sont passés par le labo car c'est de loin vous et nos soirées fédératrices au Uno's (RIP l'avant COVID) qui avaient rendu la thèse si plaisante. Merci notamment à **Théo** car tu m'as fait rire dès le premier jour et j'ai tout de suite su que je n'allais pas m'ennuyer. Ton départ a été le début d'un grand vide mais heureusement j'ai encore la chance de suivre tes one-man-show à l'apéro ! Merci aussi à **Flo** de ne pas avoir été le dernier pour les crasses, je n'oublie pas mon appartement encore une fois ;) Merci à **Victoria, Claire, Bryan, Ouada, Corentin** et **Sarah**, vous aussi vous êtes de très bonne compagnie ☺

Merci à **Nathalie** et **Emilie** et leur capricieux compagnon (FACS) pour leur aide sur la plateforme de cytométrie. Merci à **Meryem** et **Antonino** pour leurs précieux conseils et leur assistance sur la plateforme de microscopie.

Merci aux Wonder-Women du secrétariat pour le premier bonjour de la journée et parce que la vie est tellement plus simple et agréable avec vous à nos côtés ! Merci **Nathalie** pour ton aide pour les commandes et les envois et aussi parce que tu es bien la seule qui connais Briouze ;) Merci **Sophie**, notre miss labo toujours au top, pour ta bonne humeur communicative ! Merci **Michèle** pour ta gentillesse, pour avoir pris le temps de nous écouter et pour ton positivisme et ton relativisme qui m'ont marquée ! Merci **Céline** pour ta gestion à 3 000% du centre et ta disponibilité malgré tout.

Merci aux Wonder-Men de Biserte. J'ai nommé : **Thomas K, Karim** et **Laïfa**. Vous aussi, vous nous rendez la vie plus simple et agréable ☺ Spéciale dédicace à Thomas : un « Salut tout le monde ! » dans le grand labo le matin, et hop la journée peut commencer ;))

Merci aux membres du centre et des autres équipes notamment **Coline, Charlotte, William, Alessia, Antoine, Pierre**, la « **VP team** », **Maximilien, Anna** et tous les autres : vous faites régner une bonne ambiance dans Biserte.

Merci aussi à **Carine** qui a toujours cru en moi et qui sans le savoir m'a (re)donné de la motivation ;) Ça m'a manqué de ne pas avoir quelqu'un comme toi dans ce labo ! Alors merci pour ton franc-parler et ta sincérité, I'll never forget ☺

Merci aux **relecteurs** de cette thèse pour votre temps et pour avoir vu ce que je n'arrivais plus à voir : Morvane, Anaïs, maman, Kévin et mon Thomas.

Merci à mes FORMIDABLES **amis** ! Parce que le boulot, c'est sympa mais ça ne fait pas tout dans la vie, alors que les amis... Vous m'avez permis d'oublier un peu la thèse le temps d'une soirée, d'un week-end, de vacances. Merci aussi pour votre soutien, votre écoute, nos fous rires, les partages en tous genres... Restez comme vous êtes, vous êtes les meilleurs !

Merci **sister**, ma première sœur jumelle ! Mon alliée depuis 27 ans et mon soutien le plus fidèle ! Merci pour m'avoir écoutée me plaindre plus d'une fois, pour nos longs appels, nos projets, nos confidences... Vivement notre virée à Stockholm ☺ Je te souhaite le meilleur, du fond du cœur !

Merci à ma **maman** et mon **papa** ! Vous nous avez toujours encouragées à faire un métier que l'on aime et vous nous avez permis de le faire ! Faire de longues études sans avoir à se soucier de ce qu'on allait bien pouvoir manger à la fin du mois n'est malheureusement pas donné à tout le monde. Alors c'est sans doute grâce à vous (oui grâce !) que je suis en train d'écrire cette thèse aujourd'hui. Au passage, merci maman pour tous tes bons p'tits plats, une vraie cheffe ! Et comme la vie est toujours trop courte, je ne peux que vous conseiller de profiter de la retraite sans modération (et de continuer à stimuler votre cerveau, *my importante* !)

Et le meilleur pour la fin :

Merci au plus merveilleux des **amoureux, Max**, pour tous les moments passés avec toi qui m'ont fait oublier systématiquement le boulot. Merci pour ton optimisme, ta force d'esprit et ton énergie que tu me transmets ! Merci pour tout le bonheur et l'amour que tu m'apportes, tous nos projets, nos aventures passées et à venir, notre complicité sans faille. Nous sommes chanceux de nous être trouvés et au final, c'est bien ça le plus important !



RÉSUMÉ

Les tauopathies sont des maladies neurodégénératives hétérogènes caractérisées par une accumulation intracellulaire de protéines tau anormales. Six isoformes de la protéine tau sont exprimées dans les neurones du système nerveux central. Selon la tauopathie, les isoformes qui s'accumulent et les lésions formées diffèrent. Dans plusieurs tauopathies, comme la maladie d'Alzheimer, la pathologie tau affecte d'abord une région bien spécifique avant de s'étendre progressivement vers d'autres régions anatomiquement connectées. Il a été proposé que cette progression soit liée à une propagation de type prion de la pathologie tau. Selon cette hypothèse, une modification conformationnelle de la protéine tau lui permettrait de recruter et de convertir des formes normales de la protéine en formes anormales, conduisant à la formation d'agrégats intracellulaires. Ces formes anormales, dites pro-nucléantes, pourraient passer d'une cellule malade à une cellule saine afin d'initier à nouveau le processus d'agrégation. Plusieurs mécanismes permettant leur transfert intercellulaire ont été mis en évidence parmi lesquels le transport par des vésicules extracellulaires (VEs). L'objet de ces travaux de thèse est de déterminer si les VEs issues de différents fluides de patients atteints de tauopathies peuvent contenir des espèces pro-nucléantes et ainsi participer à la propagation de la pathologie tau.

Des VEs de fluide cérébral préparées à partir de cerveaux de sujets contrôles et de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), de la paralysie supranucléaire progressive (PSP) ou de la maladie de Pick, ont été isolées par chromatographie par exclusion de taille. Trois régions différemment affectées par la pathologie ont été étudiées (cortex préfrontal, cortex occipital, cervelet). Les VEs ont été transfectées dans un modèle cellulaire de nucléation basé sur le principe de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) afin d'évaluer leur potentiel de recrutement. Les VEs ont ensuite été injectées dans l'hippocampe de souris transgéniques développant une pathologie tau (THY-tau30). De plus, afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs précoces de la pathologie tau, la présence de VEs contenant des espèces pro-nucléantes de protéines tau dans le liquide cébrospinal (LCS) et le plasma de sujets contrôles et de patients atteints de MA a été évaluée dans le même modèle cellulaire.

Les VEs cérébrales issues des régions les plus touchées par la pathologie tau induisent un signal FRET significatif par rapport aux VEs issues des sujets contrôles. Ce signal est plus intense chez les patients MA que les patients PSP ou Pick où la pathologie tau est plus faible. Les VEs issues du cervelet des patients MA induisent également un signal FRET significatif bien que cette région soit dépourvue de lésion apparente. Une fois injectées dans l'hippocampe de souris, les VEs issues des patients MA sont capables de potentialiser la pathologie tau dans le modèle THY-tau30. En revanche, le modèle FRET utilisé n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'espèces pro-nucléantes dans les VEs des fluides périphériques.

Les résultats de ce projet confirment, chez l'Homme, que les VEs sont capables de transporter des espèces pro-nucléantes de tau impliquées dans la propagation de la pathologie *in vivo*, tout en soulignant l'hétérogénéité entre les tauopathies. La sécrétion vésiculaire de la protéine tau étant un processus physiologique, il est essentiel d'identifier les VEs responsables de cette propagation ainsi que la nature des espèces pro-nucléantes. Cela permettra de développer des outils thérapeutiques bloquant la propagation de la pathologie, limitant ainsi l'apparition ou l'aggravation des symptômes cognitifs.

Mots clés : Vésicules extracellulaires, maladie d'Alzheimer, propagation, prion, tauopathies, tau

ABSTRACT

Tauopathies are a group of heterogeneous neurodegenerative diseases characterized by an intracellular accumulation of tau proteins. Six isoforms of tau are found expressed in neurons, but their contribution to tau lesion is heterogeneous among tauopathies. In many of these diseases, such as Alzheimer's disease, tau pathology first affects a specific region or subpopulation of cells before spreading to other anatomically connected regions. It has been proposed that this spreading could be due to a prion-like propagation. According to this hypothesis, conformational changes of a tau protein would allow it to recruit and convert physiological forms of tau into abnormal forms leading to the formation of aggregates. These abnormal forms, called seeds, could transfer from a diseased cell to a healthy one, recruiting and converting tau proteins in the latter. Several mechanisms allowing this hypothesized intercellular transfer have been elucidated, including transport by extracellular vesicles (EVs). The overarching goal of this PhD work was to determine whether human derived-EVs could contain tau seeds and thus participate to the propagation of tau pathology in various tauopathies.

In order to achieve this aim, brain derived-EVs prepared from brains of control subjects and patients with Alzheimer's disease (AD), progressive supranuclear palsy (PSP) or Pick's disease were isolated by size exclusion chromatography. Three regions differently affected by the pathology were studied (prefrontal, occipital, cerebellum). EVs were transfected into a cell seeding assay based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). EVs were then injected into the hippocampus of transgenic mice developing tau pathology (THY-tau30). Additionally, to identify potential new biomarkers of tau pathology, the presence of EVs containing tau seeds was evaluated in the seeding assay in cerebrospinal fluid (CSF) and plasma of control subjects and patients with AD.

Brain derived-EVs from the most affected regions by tau pathology induce a significant FRET signal compared to EVs from controls. This signal is more intense in AD patients than in PSP or Pick patients where the tau pathology is weaker. EVs from the cerebellum of AD patients also induce a significant FRET signal although this region is devoid of apparent tau lesion. Once injected into the mouse hippocampus, EVs from AD patients are able to potentiate the tau pathology in THY-tau30. On the other hand, the FRET assay failed to demonstrate the presence of tau seeds in EVs from peripheral fluids.

The results of this PhD work confirm, in humans, that EVs are able of transport tau seeds involved in the prion-like propagation of tau pathology *in vivo*, while highlighting the heterogeneity between tauopathies. Importantly, as the secretion of tau in EVs is a physiological process, new tools are needed to identify EVs subpopulations responsible of this propagation as well as the identity of tau seeds. Finally, this original approach would pave the way to new therapeutic perspectives that would stop tau pathology spreading, ultimately preventing cognitive symptoms progression.

Key words: Extracellular vesicles, Alzheimer's disease, prion-like propagation, tauopathies, tau, progressive supranuclear palsy, Pick's disease

COMMUNICATIONS ET FORMATIONS

Communications :

- Écrite – NeuroFrance 2019 à Marseille
- Orale – FSEV (Société Française des Vésicules Extracellulaires) 2019 à Nantes
- Orale - Journée André Verbert 2020 - Colloque des doctorants de Lille en virtuel
- Orale - AD/PD 2021 en virtuel
 - o Rapport de la communication dans “Current trends in extracellular vesicle research on neuroscience from ADPD2021 meeting” rédigé par Tsuneya Ikezu <https://evcna.com/article/view/3963>
- Écrite – NeuroFrance 2021 en virtuel

Formations :

- Préparation au concours « Ma thèse en 180 secondes »
- Statistiques : Notions fondamentales et traitement des petits échantillons
- Communication scientifique en anglais
- Droit du travail dans le secteur privé
- Jeunes chercheurs, initiez-vous à l'entreprise
- Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche
- Financement de la recherche sur projets
- L'entretien de recrutement : Préparation et entraînement aux différentes phases de l'entretien
- Grand public/vulgarisation – « Sunday Happy Funday » organisé par l'Aéronef de Lille - Atelier Neurosciences
- Apprentis Chercheurs, programme organisé par l'Arbre des connaissances
- Expérimentation animale niveau 1

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	I
RÉSUMÉ	VII
ABSTRACT	IX
COMMUNICATIONS ET FORMATIONS	XI
SOMMAIRE	XIII
LISTE DES FIGURES	XVII
LISTE DES TABLEAUX	XIX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XX
INTRODUCTION	1
CONTEXTE HISTORIQUE	3
I- LA PROTEINE TAU : DE LA PHYSIOLOGIE A LA PATHOLOGIE	4
1. Du gène à la protéine.....	4
2. Structure de la protéine tau.....	5
3. Expression de la protéine tau.....	6
4. Fonctions physiologiques.....	7
5. Vers la pathologie... ..	8
5.1. Modifications post-traductionnelles.....	8
5.2. Agrégation de la protéine tau.....	9
5.3. Lien entre modifications post-traductionnelles et agrégation ?.....	10
5.4. Perte de fonction normale ou gain de fonction toxique ?.....	10
II- LES TAUOPATHIES	11
1. Étiologie.....	12
1.1. Les tauopathies sporadiques.....	12
1.2. Les tauopathies génétiques.....	13
2. Hétérogénéité clinique inter- et intra- tauopathies.....	15
2.1. La maladie d'Alzheimer.....	15
2.2. La paralysie supranucléaire progressive.....	15
2.3. Des démences fronto-temporales à la maladie de Pick.....	16
3. Hétérogénéité lésionnelle.....	17
3.1. Inclusions de protéines tau.....	17
3.2. Autres inclusions protéiques.....	18
4. Hétérogénéité de progression spatio-temporelle des lésions.....	20
5. Vulnérabilité cellulaire.....	23
III- PROPAGATION DE LA PATHOLOGIE TAU	24
1. Les maladies à prions.....	24
1.1. Transmissibilité intra-espèce.....	25
1.2. Transmissibilité inter-espèces.....	25
1.3. Existence de souches.....	26
1.4. « Propagation » du concept prion à d'autres protéines.....	26
2. Propagation de type prion de la pathologie tau.....	27
2.1. Transmission de la pathologie tau.....	27
2.2. Existence de souches ?.....	28

2.3.	Taille moléculaire des espèces de tau responsables de la propagation	30
2.4.	Propagation intercellulaire de la protéine tau	31
2.4.1.	Liquide interstitiel : support de la propagation	31
2.4.2.	Propagation trans-synaptique ou extra-synaptique ?	32
3.	Mécanismes de propagation intercellulaire	34
3.1.	Les nanotubes.....	35
3.2.	La sécrétion sous forme libre	35
3.2.1.	Mécanismes de sécrétion	35
3.2.2.	Mécanismes de capture.....	36
3.3.	Les vésicules extracellulaires	36
3.3.1.	Mécanismes de biogénèse et de sécrétion vésiculaire	39
3.3.2.	Mécanismes d'internalisation.....	41
3.3.3.	Techniques d'isolement	42
3.3.4.	Limites dans l'étude des VEs.....	43
3.3.5.	Implication des VEs dans la propagation de la pathologie tau	44
3.4.	Devenir de la protéine tau après son internalisation	45
IV-	DE LA MECANISTIQUE AU DIAGNOSTIC : LA PLACE DES VES.....	45
1.	À la recherche de biomarqueurs	45
2.	Mécanismes de drainage de l'ISF dans le LCS et le sang	46
3.	Diagnostic actuel	48
4.	Et dans le futur ?.....	49
4.1.	Imagerie cérébrale.....	49
4.2.	Sous quelle forme la protéine tau se retrouve-t-elle dans le LCS et le plasma ?	50
4.3.	La place des VEs.....	50
	OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	53
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	57
I-	MATÉRIELS.....	59
1.	Modèles cellulaires <i>in vitro</i>	59
1.1.	Lignées cellulaires HEK-293T	59
1.2.	Culture primaire de neurones corticaux.....	59
2.	Modèles transgéniques murins	59
3.	Échantillons humains	60
3.1.	Tissu cérébral.....	60
3.2.	LCS intraventriculaires, LCS lombaires et plasmas congelés	60
3.3.	Cohorte ecTAUsome	60
4.	Préparation des échantillons	62
4.1.	Fluide cérébral	62
4.2.	Isolement vésiculaire	62
4.2.1.	Colonne de chromatographie par exclusion de taille	62
4.2.2.	Protocole classique d'enrichissement des VEs	62
4.2.3.	Protocole optimisé pour séparer les grandes et les petites VEs.....	63
4.3.	Concentration vésiculaire	65
4.4.	Infection lentivirale.....	65
4.5.	Injections stéréotaxiques des VEs de fluide cérébral humain	65
II-	MÉTHODES	66
1.	Analyses des échantillons	66

1.1.	Analyse du suivi individuel des particules (NTA)	66
1.2.	Dosages protéiques	66
1.3.	Western-blot et gel d'argent	67
1.4.	Dosage immuno-enzymatique (ELISA).....	67
1.4.1.	INNOTEST hTau	67
1.4.2.	ELISA V5	68
1.4.3.	ELISA A β 40 et A β 42.....	68
1.4.4.	Simoa [®]	68
1.5.	Immunodéplétion	68
1.6.	Traitement à la protéinase K	69
1.7.	FRET et cytométrie en flux.....	69
1.8.	Microscopie électronique	70
1.9.	Internalisation neuronale de tau via les VEs	70
1.10.	Immunofluorescence et microscopie confocale.....	71
1.11.	Immunohistochimie sur coupes flottantes	71
1.11.1.	Coupes humaines.....	71
1.11.2.	Coupes murines	71
1.12.	Spectrométrie de masse.....	72
2.	Analyses statistiques.....	72
 RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		75
I- IMPLICATION DES VES DANS LA PROPAGATION DE LA PATHOLOGIE TAU		77
1.	La protéine tau ne module pas la sécrétion vésiculaire globale	77
2.	Les VEs cérébrales transportent des espèces pro-nucléantes de tau capables de transmettre la pathologie tau in vivo.....	79
2.1.	Le fluide cérébral murin contient des VEs transportant la protéine tau	80
2.2.	Les VEs cérébrales transportent des espèces pro-nucléantes de tau dans un modèle murin de tauopathie	82
2.3.	Les VEs cérébrales transportent des espèces pro-nucléantes dans plusieurs tauopathies sporadiques..	86
2.4.	Lien entre la pathologie tau et la présence d'espèces pro-nucléantes dans les VEs dans plusieurs tauopathies sporadiques	91
2.5.	Les VEs transportant des espèces pro-nucléantes sont capables de transmettre la pathologie tau in vivo.....	93
2.6.	Quelle est la place des espèces de tau non vésiculaire ?	96
2.7.	Influence des peptides A β sur les capacités de nucléation des VEs	97
3.	Internalisation neuronale de la protéine tau médiée par les VEs	98
DISCUSSION - CONCLUSION		101
4.	Quelles VEs sont impliquées dans la propagation ? Séparation de sous-types vésiculaires basée sur la taille.....	105
DISCUSSION - CONCLUSION		117
 II- LES VES COMME BIOMARQUEURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ?		119
1.	Absence de détection d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs de LCS et de plasma.....	119
2.	La cohorte ecTAUsome	127
DISCUSSION - CONCLUSION		132
 PERSPECTIVES ET CONCLUSION		135

PERSPECTIVES	137
1. Décrypter l'identité des VEs et des espèces pro-nucléantes de tau impliquées dans la propagation de la pathologie tau.....	137
2. À la recherche de biomarqueurs dans les VEs des fluides périphériques.....	139
CONCLUSION.....	141
 BIBLIOGRAPHIE	 143
 ANNEXES	 199
Cohorte ecTAUsome (critères d'inclusion et d'exclusion).....	201
Données démographiques et cliniques.....	203
Publication 1 : <i>Extracellular vesicles: major actors of heterogeneity in tau spreading among human tauopathies</i>	207
Publication 2 : <i>Vésicules extracellulaires et système nerveux</i>	247

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Portraits du Dr. Aloïs Alzheimer et de sa patiente, Auguste Deter.....	3
Figure 2 : Gène MAPT, transcrit primaire et isoformes de la protéine tau exprimées dans le système nerveux central.....	5
Figure 3 : Structure de la protéine tau.....	6
Figure 4 : Repliement schématique de la protéine tau liée aux MT et libre dans le cytoplasme.....	6
Figure 5 : Fonctions physiologiques de la protéine tau.....	7
Figure 6 : Modifications post-traductionnelles de la protéine tau.....	9
Figure 7 : Fonctions pathologiques de la protéine tau.....	11
Figure 8 : Mutations de MAPT dans les FTDP-17.....	14
Figure 9 : Morphologie et composition en isoformes de tau des inclusions observées dans différentes tauopathies.....	17
Figure 10 : Schéma illustrant le large éventail de pathologies dans lesquelles les inclusions tau sont accompagnées de dépôts d'autres protéines couramment associées à d'autres maladies....	19
Figure 11 : Clivages de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP).....	20
Figure 12 : Stades de progression de la pathologie tau dans la MA, la PSP et Pick.....	21
Figure 13 : Hétérogénéité de la distribution des DNF en fonction des sous-types de MA.....	22
Figure 14 : Transmission inter-espèces d'un PrPSc bovin mal replié.....	26
Figure 15 : Classification des tauopathies selon la structure des cœurs des filaments de tau.....	29
Figure 16 : Étapes de transition entre la protéine tau monomère soluble et les dégénérescences neurofibrillaires.....	30
Figure 17 : Système interstitiel cérébral entourant les cellules et comprenant le liquide interstitiel, la matrice extracellulaire et le système vasculaire.....	32
Figure 18 : Mécanismes de transfert intercellulaire de la protéine tau.....	34
Figure 19 : Caractéristiques physiques des différentes particules sphériques qu'il est possible de retrouver dans les fluides extracellulaires.....	37
Figure 20 : Formation schématique des grandes sous-catégories de vésicules extracellulaires.....	38
Figure 21 : Mécanismes de biogénèse des VEs.....	40
Figure 22 : Mécanismes d'internalisation des vésicules extracellulaires.....	42
Figure 23 : Voies de drainage de l'ISF vers le LCS.....	46
Figure 24 : Mécanismes potentiels de passage des VEs à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE).....	48
Figure 25 : Critères ATN proposés par la NIA-AA.....	49

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Figure 26 : Représentation schématique du modèle de nucléation tau HEK-FRET.....	59
Figure 27 : Schéma expérimental pour le traitement des échantillons de LCS et de plasma dans la cohorte ecTAUsome.....	61
Figure 28 : Principe de la chromatographie par exclusion de taille.....	63
Figure 29 : Protocole optimisé pour la séparation des grandes et des petites VEs sécrétées par des CP de neurones de souris.....	64
Figure 30 : Protocole optimisé pour la séparation des grandes et des petites VEs contenues dans le FC humain.....	64

Figure 31 : Principe de fonctionnement du NanoSight NS300	66
Figure 32 : Photos de microscopie électronique de VEs avant et après 30 min dans un bain à sonication	69

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Figure 33 : L’extinction de l’expression de la protéine tau ne modifie pas la sécrétion vésiculaire neuronale globale.....	78
Figure 34 : L’absence d’expression de la protéine tau ne modifie pas la sécrétion vésiculaire globale dans le cerveau murin.....	78
Figure 35 : Influence de la présence d’une pathologie tau sur la sécrétion vésiculaire globale dans le cerveau murin.....	79
Figure 36 : Le fluide cérébral murin contient des VEs.....	82
Figure 37 : Illustrations des lésions tau dans l’hippocampe de souris Tau30	82
Figure 38 : Des espèces pro-nucléantes de tau sont présentes dans les VEs cérébrales d’un modèle murin de tauopathie	85
Figure 39 : Illustrations et quantification des lésions tau dans les tauopathies	87
Figure 40 : Le fluide cérébral humain contient des VEs.....	87
Figure 41 : La sécrétion vésiculaire de tau n’est pas modifiée par la présence d’une pathologie tau.....	89
Figure 42 : Les VEs cérébrales de patients atteints de tauopathies contiennent des espèces pro-nucléantes.....	91
Figure 43 : Corrélation entre le signal FRET des VEs de FC humain et la lésion tau dans chaque région et pour chaque groupe de sujets	92
Figure 44 : Espèces pro-nucléantes dans la fraction cellulaire du FC humain.....	92
Figure 45 : Corrélation entre le signal FRET dans la fraction cellulaire du FC humain et la lésion tau dans chaque région et pour chaque groupe d’individus	93
Figure 46 : Les VEs cérébrales de patients MA entraînent un changement conformationnel de la protéine tau humaine endogène dans les souris transgéniques Tau30.....	95
Figure 47 : Les VEs cérébrales de patients MA potentialisent la formation de lésions contenant des formes phosphorylées et agrégées de tau dans les souris transgéniques Tau30	96
Figure 48 : Répartition de la protéine tau contenue dans le FC humain après purification par SEC.....	97
Figure 49 : Dosage des peptides A β dans les VEs de FC humain	98
Figure 50 : Accumulation de VEs de FC murin dans des neurones primaires.....	99
Figure 51 : Internalisation neuronale de la protéine tau via des VEs de FC murin.....	100
Figure 52 : Optimisation de la séparation des grandes et des petites VEs sécrétées par des neurones primaires corticaux de souris.....	106
Figure 53 : Analyse protéomique des petites et des grandes VEs sécrétées par des neurones primaires corticaux de souris	107
Figure 54 : Optimisation de la séparation des grandes et des petites VEs isolées à partir de FC humain.....	109
Figure 55 : Évaluation de la perte vésiculaire liée à l’ajout des étapes de centrifugation dans le protocole d’optimisation.....	110
Figure 56 : Les grandes VEs de FC de patients MA transportent davantage d’espèces pro-nucléantes de tau que les petites VEs.....	111
Figure 57 : Analyse descriptive des 4 groupes vésiculaires	113

Figure 58 : Analyse protéomique différentielle entre les petites et les grandes VEs pour chaque groupe de sujets.....	115
Figure 59 : Analyse protéomique différentielle entre les sujets contrôles et les patients MA pour chaque groupe de VEs.....	116
Figure 60 : Le LCS contient des VEs.....	120
Figure 61 : Absence de détection d'espèce pro-nucléante de tau dans les VEs de LCS de patients MA.....	121
Figure 62 : Concentration vésiculaire dans le FC et le LCS humain.....	121
Figure 63 : Le LCS intraventriculaire contient des VEs.....	123
Figure 64 : Des espèces pro-nucléantes de tau sont détectées dans les VEs de LCS intraventriculaire.....	123
Figure 65 : La technique de prélèvement en post-mortem peut influencer la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs de LCS.....	124
Figure 66 : Le plasma contient des VEs.....	124
Figure 67 : Absence de détection d'espèce pro-nucléante de tau dans les VEs de plasma.....	126
Figure 68 : Photos de microscopie électronique de la fraction vésiculaire plasmatique obtenue par SEC.....	127
Figure 69 : Hypothèse de travail.....	128
Figure 70 : Distribution vésiculaire dans le LCS des sujets de la cohorte ecTAUsome.....	128
Figure 71 : Hétérogénéité de la distribution vésiculaire dans le LCS au sein du groupe 2.....	129
Figure 72 : Distribution vésiculaire dans le plasma des sujets de la cohorte ecTAUsome.....	129
Figure 73 : Hétérogénéité de la distribution vésiculaire dans le plasma au sein du groupe 2..	130
Figure 74 : Concentration en protéines tau totales chez des sujets MA.....	131

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Figure 75 : Représentation schématique du principe de la PMCA développée pour le diagnostic des maladies à prions.....	140
---	-----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste non exhaustive des tauopathies.....	12
Tableau 2 : Nombre d'inclusions dans l'étude ecTAUsome depuis décembre 2017.....	61
Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés en western-blot.....	67
Tableau 4 : Critères d'inclusion et d'exclusion communs aux 5 groupes.....	201
Tableau 5 : Critères d'inclusion spécifiques aux groupes dans la cohorte ecTAUsome.....	202
Tableau 6 : Données démographiques, cliniques et biologiques des patients donateurs pour la préparation du fluide cérébral.....	203
Tableau 7 : Données démographiques, cliniques et biologiques des patients non MA donateurs de LCS ante-mortem.....	204
Tableau 8 : Données démographiques et biologiques des patients MA donateurs de LCS.....	205
Tableau 9 : Données démographiques, cliniques et biologiques des patients donateurs de LCS post-mortem.....	206
Tableau 11 : Données démographiques et cliniques des patients non MA donateurs de plasma.....	206
Tableau 10 : Données démographiques et cliniques des patients MA donateurs de plasma.....	206

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADAM10 : *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*
ADN : Acide désoxyribonucléique
AICD : *Amyloid precursor protein intracellular domain*
ALIX : *ALG-2 Interacting Protein X*
APOE : Apolipoprotéine E
APP : Protéine précurseure de l'amyloïde
ARF6 : *ADP Ribosylation Factor 6*
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
A β : Peptides β -amyloïde
BACE1 : *Beta-site APP cleaving enzyme 1*
BAG3 : *BCL2-associated athanogene 3*
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BIN1 : *Bridging Integrator-1*
BSA : Albumine de sérum bovin
CA (1,4) : Corne d'Ammon
CD (9, 11b, 47, 59, 63, 81) : Clusters de différenciation
CFP : *Cyan Fluorescent Protein*
CHMP2B : *Charged Multivesicular Body Protein 2B*
CP : Cultures primaires
CRB : Centre de ressources biologiques
DAPI : *Di Aminido Phenyl Indol*
DCB : Dégénérescence corticobasale
DFT : Démences fronto-temporales
DIV : *Days in vitro*
DNF : Dégénérescences neurofibrillaires
DPM : Délai post-mortem
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ESCRT : Complexe de tri endosomal requis pour le transport (en anglais *endosomal sorting complex required for transport*)
FC : Fluide cérébral
FDG : Fluorodésoxyglucose
FRET : Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (en anglais *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)
FTDP-17 : Démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFAP : *Glial fibrillary acidic protein*
GOCC : *Gene Ontology* pour le terme composant cellulaire
GTPase : Enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la Guanosine TriPhosphate (GTP)
g-VEs : Grandes vésicules extracellulaires
GWAS : Études d'association pangénomique (en anglais *genome-wide association study*)
HDL : Lipoprotéine de haute densité
HEK : *Human Embryonic Kidney*
HSP90 : *Heat shock protein 90*

HSPG : Héparanes sulfates protéoglycanes
Iba1 : *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*
IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire
IHC : Immunohistochimie
ILV : Vésicules intraluminales (en anglais *intraluminal vesicles*)
IPSc : Cellules souches pluripotentes induites (en anglais *induced pluripotent stem cells*)
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ISF : Liquide interstitiel
L1CAM : *L1 cell adhesion molecule*
LAMP (1, 2) : *Lysosomal-associated membrane protein*
LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem
LCS : Liquide cérébro-spinal
LDL : Lipoprotéine de basse densité
LRP1 : *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*
MA : Maladie d'Alzheimer
MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*
MAP : Protéines associées aux microtubules
MBP : *Myelin basic protein*
MCI : Déficit cognitif léger (en anglais *Mild Cognitive Impairment*)
MEC : Matrice extracellulaire
MFI : Intensité de fluorescence médiane
MGA : Maladie à grains argyrophiles
MISEV : Liste de recommandations pour l'étude des vésicules extracellulaires (en anglais *Minimal information for studies of extracellular vesicles*)
MMSE : *Mini-mental state examination*
MOG : *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*
MPT : Modifications post-traductionnelles
MT : Microtubules
MVB : Corps multivésiculaires (en anglais *multivesicular body*)
m-VEs = Mix de grandes et de petites vésicules extracellulaires
N2A : Lignée cellulaire de neuroblastome murin
NCAM : *Neural Cell Adhesion Molecule*
NIA-AA : *National Institute on Aging - Alzheimer's Association*
NT : Fils de neuropile
NTA : Analyse du suivi individuel des particules (en anglais *Nanoparticles Tracking Analysis*)
PBS : Tampon phosphate salin
PFA : Paraformaldéhyde
PHF : Filaments appariés en hélice (en anglais *paired helical filament*)
Pick : Maladie de Pick
PIP2 : *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*
PK : Protéinase K
PLD3 : *Phospholipase D Family Member 3*
PLP : *Myelin proteolipid protein*
PMCA : Amplification cyclique de repliement des protéines (en anglais *Protein Misfolding Cyclic Amplification*)
PrPc : Protéine prion cellulaire (forme physiologique)
PrPSc : Protéine prion « scrapie » (forme pathologie)

PSP : Paralyse supranucléaire progressive
ptau : Protéine tau phosphorylée
p-VEs : Petites vésicules extracellulaires
RD (ou R) : Domaines de répétitions de tau
S100B : *S100 calcium-binding protein B*
SDS : *Sodium dodecyl sulfate*
SEC : Chromatographie par exclusion de taille (de l'anglais *size exclusion chromatography*)
SF : Filaments droits
SNARE : *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*
SNC : Système nerveux central
TA : Température ambiante
Tau30 : Modèle de souris transgénique THY-tau30
TDP-43 : Protéine 43 de liaison à l'ADN TAR
TEP : Tomographie par émission de positons
TREM2 : *Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*
TSG101 : Gène de sensibilité aux tumeurs 101
UC : Ultracentrifugation
VEs : Vésicules Extracellulaires
VPS4 : Protéine 4 associée au tri des protéines vacuolaires
WGA : *Wheat germ agglutinin*
WT : Souris sauvages (en anglais *wild-type*)
YFP : *Yellow Fluorescent Protein*

INTRODUCTION

Contexte historique

En 1901, à l'hôpital de Francfort, le docteur Aloïs Alzheimer reçoit pour la première fois en consultation Auguste D., une femme de 51 ans qui présente des symptômes de désorientation, de paranoïa, de délires, d'hallucination, et un déficit cognitif (Alzheimer., 1907; Maurer et al., 1997). Il la suit jusqu'à sa mort le 8 avril 1906. En novembre, il présente ce cas à la 37^{ème} Conférence de Psychiatrie du sud-ouest de l'Allemagne. Il corrèle alors ses symptômes à deux types d'inclusions qu'il observe dans son cerveau (Alzheimer., 1907). Plus tard, ces inclusions seront désignées par le nom de plaques séniles et dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et la maladie prendra son nom. Les plaques séniles sont des agrégats extracellulaires composés de peptides β -amyloïde ($A\beta$) clivés à partir de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP, pour *amyloid precursor protein*). Les DNF sont des agrégats intracellulaires composés de protéines tau.

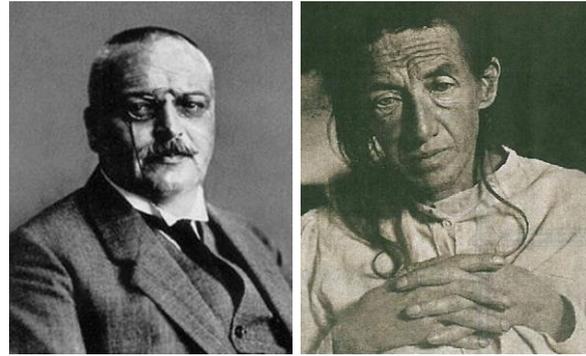


Figure 1 : Portraits du Dr. Aloïs Alzheimer (à gauche) et de sa patiente, Auguste Deter (à droite). Images libres de droits.

Pendant la majeure partie du siècle, les recherches sur la maladie d'Alzheimer (MA) stagnent. Puis, au milieu des années 1980, il a été découvert que le peptide $A\beta$ est le composant majoritaire des plaques séniles (Glennner et al., 1984). Parallèlement, en 1985, plusieurs équipes identifient la protéine tau comme étant le composant majoritaire des DNF (Brion et al., 1985; Delacourte & Defossez, 1986).

Dans les années 1990, la découverte des mutations sur le gène de l'APP dans les formes héréditaires de MA (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991; Murrell et al., 1991; Naruse et al., 1991; Yoshioka et al., 1991) conduit à formuler l'hypothèse de la cascade amyloïde (J. A. Hardy & Higgins, 1992; J. Hardy & Allsop, 1991). Elle postule que la formation des plaques séniles est le point de départ du développement de la MA et initie tout événement physiopathologique associé (formation des DNF, dysfonctionnement synaptique, inflammation, neurodégénérescence, démence). Les DNF seraient donc une simple conséquence de la présence des dépôts amyloïdes. Beaucoup de chercheurs se sont alors focalisés sur les mécanismes de production des peptides $A\beta$ et leur agrégation. Du fait de cette dominance, la majorité des recherches amènent à proposer des stratégies thérapeutiques visant soit à diminuer la production et l'agrégation d' $A\beta$, soit à améliorer sa clairance. Seulement, à ce jour, les essais cliniques ciblant $A\beta$ n'ont pas, ou peu, eu d'effet sur la pathologie tau et sur les symptômes alors que les plaques ont été significativement réduites (Karran et al., 2011). Pour certaines personnes, ces échecs dans les essais cliniques poussent à se questionner sur la responsabilité d' $A\beta$ dans tous les événements physiopathologiques liés à la MA. L'hypothèse de la cascade amyloïde est alors devenue très critiquée et beaucoup moins influente. Elle a depuis été reconsidérée (J. Hardy & Selkoe, 2002; Selkoe & Hardy, 2016). Toutefois, les liens entre $A\beta$ et tau dans l'initiation et la progression de la MA restent encore mal compris.

Dans la MA, la progression des DNF, mais pas celle des plaques séniles, corrèle avec l'évolution des symptômes et la sévérité du déclin cognitif (Arriagada et al., 1992). Grâce à la tomographie par émission de positons (TEP) et au développement de radiotraceurs ciblant la protéine tau, il a été montré, du vivant des patients, que la pathologie tau corrèle avec le dysfonctionnement neuronal et l'atrophie cérébrale (Franzmeier et al., 2020; Hoenig et al., 2018; Iaccarino et al., 2018; Ishiki et al., 2015; Ossenkoppele et al., 2016, 2019; Schöll et al., 2016; Sepulcre et al., 2016; Vogel et al., 2020). De plus, chez les patients, les inclusions de protéines tau semblent apparaître des dizaines d'années avant celles d'A β (Braak et al., 2011; Duyckaerts, 2011; Duyckaerts & Hauw, 1997). En revanche, chez des sujets âgés ne présentant pas de signe de démence, des dépôts diffus d'A β peuvent être observés sans inclusion de protéines tau (Delaère et al., 1990). La relevance de la formation d'inclusions de protéines tau dans le processus de neurodégénérescence devient évidente en 1998, quand des mutations autosomiques dominantes du gène MAPT sont identifiées comme étant la cause de démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (FTDP-17) (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Ces travaux établissent que la voie pathologique conduisant des monomères de tau à s'assembler en filaments est suffisante pour causer une neurodégénérescence et une démence. Dans ces démences, il n'y a pas de formation de plaques séniles. C'est grâce à ces découvertes que la protéine tau est aujourd'hui largement étudiée, majoritairement dans un contexte de maladies neurodégénératives.

I- La protéine tau : de la physiologie à la pathologie

La protéine tau (pour *tubulin associated unit*) a été isolée pour la première fois en 1975 à partir d'une fraction microtubulaire issue de cerveau de porc (Weingarten et al., 1975). Depuis, elle est communément décrite comme étant une protéine associée aux microtubules (MAP pour *microtubule-associated protein*). Les microtubules (MT) sont des composants du cytosquelette et sont eux-mêmes composés d'hétérodimères d' α - et de β -tubuline. La protéine tau est capable de promouvoir leur polymérisation pour former les MT, les stabiliser et moduler leur dynamisme.

1. Du gène à la protéine

La protéine tau est codée par le gène MAPT situé sur le chromosome 17 en position 17q21 (Neve et al., 1986). MAPT comprend 16 exons (**figure 2**). Les exons 0 et 14 sont transcrits mais pas traduits. Les exons 4A, 6 et 8 ne sont pas transcrits dans le système nerveux central (SNC). L'exon 4A est quant à lui transcrit dans le système nerveux périphérique. Sa traduction donne naissance à une isoforme de tau de 758 acides aminés appelée « big tau » (Couchie et al., 1992; Georgieff et al., 1991; Goedert et al., 1992). Dans le SNC, l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 conduit à la formation de 6 isoformes de 352 à 441 acides aminés qui diffèrent par la présence de 0, 1 ou 2 inserts de 29 acides aminés chacun en position N-terminale (respectivement 0N, 1N ou 2N) et par la présence de 3 ou 4 répétitions (R1, R2, R3 et R4) dans les domaines de liaison aux MT (respectivement 3R ou 4R) dans la moitié C-terminale. L'exon 3 ne peut pas être transcrit sans l'exon 2. Les exons 9 à 12 codent pour les 4 répétitions des domaines de liaison aux MT. La traduction de l'exon 10 permet l'inclusion d'une 4^{ème} répétition de 31 acides aminés située entre la répétition R1 et R3 (**figure 2**).

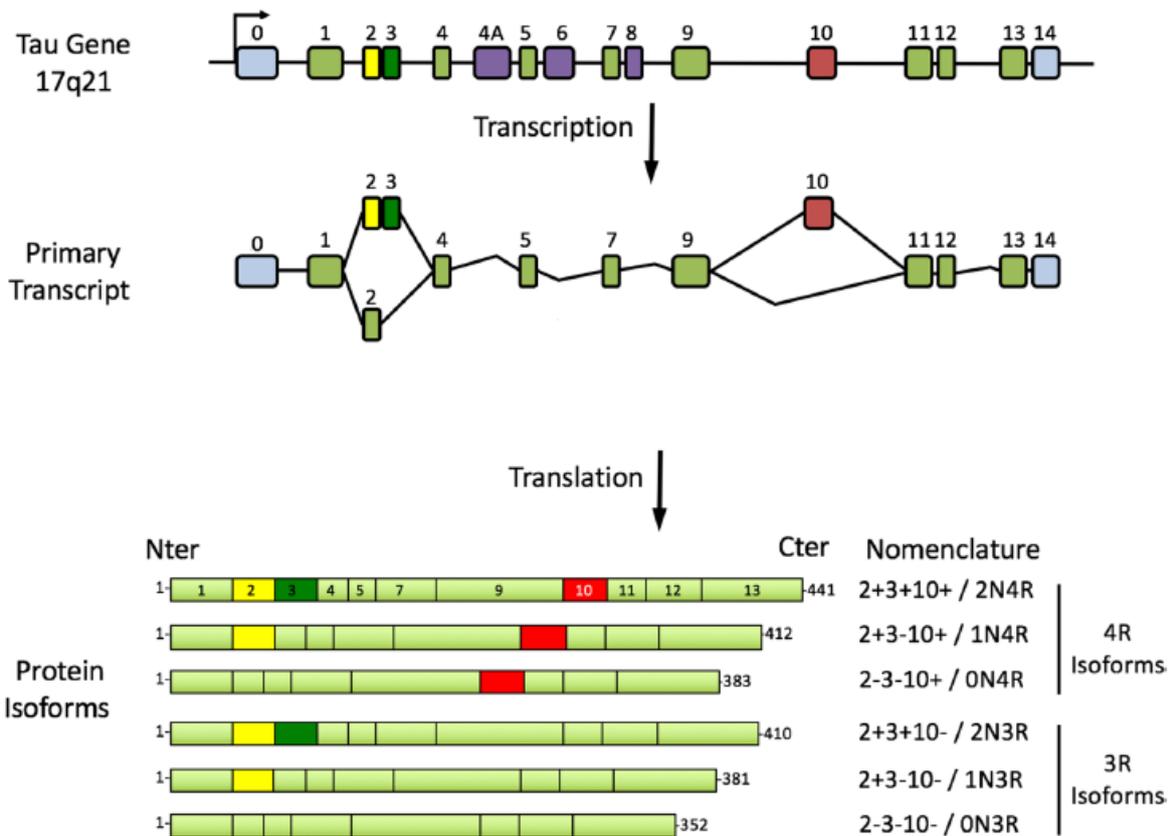


Figure 2 : Gène MAPT, transcrit primaire et isoformes de la protéine tau exprimées dans le système nerveux central. 6 isoformes sont exprimées (352-441 acides aminés) en fonction de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10. L'épissage alternatif de l'exon 10 donne naissance à 3 isoformes 3R (avec 3 domaines de répétitions) ou 3 isoformes 4R (avec 4 domaines de répétitions). Modifiée d'après Colin et al., 2020.

2. Structure de la protéine tau

La protéine tau est une protéine thermostable, très soluble et nativement dépliée qui résiste normalement à l'agrégation. Elle peut être divisée en 4 parties (**figure 3**) :

- Un domaine de projection dans la partie N-terminale. Il se projette des MT pour interagir avec d'autres protéines notamment présentes à la membrane plasmique (Brandt et al., 1995).
- Un domaine riche en prolines dans la partie centrale. Il contient 7 motifs PxxP qui permettent une interaction avec des protéines contenant un domaine SH3 (pour *Src homology 3*) (Reynolds et al., 2008; Sottejeau et al., 2015).
- Des domaines de répétition ou d'assemblage aux MT. Ils interagissent avec l' α - et la β -tubuline pour permettre leur polymérisation et former les MT (Kellogg et al., 2018). La protéine tau est très présente au niveau labile des MT, lorsqu'ils ne sont pas stables. Des travaux mettent notamment en évidence des interactions rapides (environ 40 ms) avec les MT (Janning et al., 2014). Cela a conduit à formuler l'hypothèse que la protéine tau permettrait le dynamisme plutôt que la stabilisation des MT.
- Une partie C-terminale située à la suite des domaines de répétition. Jusqu'à présent, ni sa fonction, ni les protéines qui s'y lient, n'ont été bien établies.

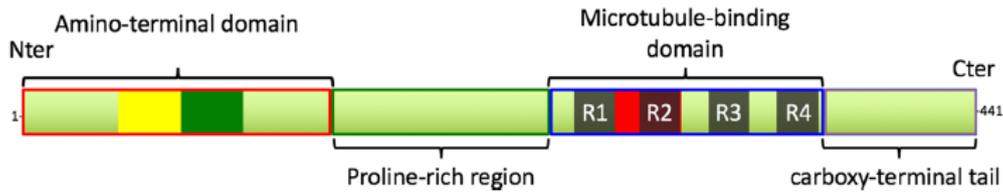


Figure 3 : Structure de la protéine tau. L'isoforme la plus longue (2N4R) est représentée. La protéine tau peut être divisée en 4 domaines ayant chacun des propriétés biochimiques différentes : le domaine acide N-terminal (expression des exons 1 à 5), le domaine basique riche en prolines (expression des exons 7 et 9), le domaine de liaison aux microtubules comprenant les 4 séquences répétées (R1-R4) et le domaine C-terminal (expression de l'exon 13). Colin et al., 2020.

La protéine tau est décrite comme une protéine nativement dépliée ayant une conformation flexible sans structures secondaire et tertiaire bien définies (Mukrasch et al., 2009). Cependant, cela n'empêche pas son repliement entre ses domaines différemment chargés. Une conformation dite « en trombone » de la tau soluble a été proposée avec la partie C-terminale repliée sur les domaines de répétition et la partie N-terminale repliée sur l'extrémité C-terminale (Jeganathan et al., 2006). Ce repliement est réduit lorsque la protéine tau est liée aux MT (figure 4) (Ramachandran & Udgaonkar, 2013). Néanmoins, rien n'est encore totalement acté sur la structure de cette protéine car elle dépend beaucoup des conditions expérimentales et des techniques d'analyse. Une étude récente a notamment décrit une structure globulaire de la protéine tau native soluble (Popov et al., 2019).

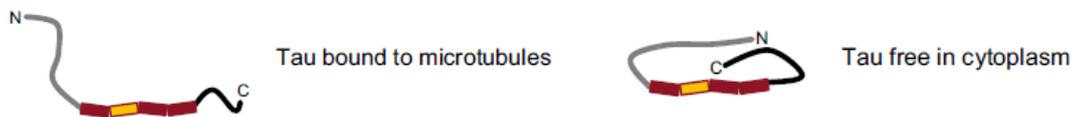


Figure 4 : Repliement schématique de la protéine tau liée aux MT et libre dans le cytoplasme (conformation en trombone). T. Guo et al., 2017.

3. Expression de la protéine tau

L'expression des différentes isoformes de tau diffèrent en fonction du développement, de la région cérébrale et du type cellulaire mais aussi selon les organes et les espèces étudiés (Andreadis, 2012; Trabzuni et al., 2012). Globalement, dans le cerveau adulte, la protéine tau est exprimée dans les neurones. Des niveaux d'expression similaires entre les isoformes 3R et 4R sont retrouvés (Goedert & Jakes, 1990). Les isoformes 2N sont quant à elles sous-représentées par rapport aux isoformes 1N et 0N (respectivement 9%, 54% et 37%) (Goedert & Jakes, 1990). Cependant, l'expression des différentes isoformes varie entre les régions cérébrales et les types neuronaux. Par exemple, dans le cervelet, la quantité de tau 0N3R est plus faible que dans les autres régions, quant aux isoformes 4R, c'est dans le pallidum qu'elles sont le plus exprimées (McMillan et al., 2008). La protéine tau est principalement exprimée dans le lobe frontal et temporal (Trojanowski et al., 1989). Dans le néocortex, son expression est deux fois plus importante que dans le cervelet (Trabzuni et al., 2012).

L'expression de la protéine tau est régulée au cours du développement. Dans le SNC adulte, les 6 isoformes sont exprimées alors que dans le cerveau foetal, seule l'isoforme 0N3R est exprimée. L'absence du 4^{ème} domaine d'assemblage aux MT pendant le développement peut-être liée à un besoin de dynamisme plus important pendant la mise en place des réseaux neuronaux (Goedert et al., 1989; Kosik et al., 1989). Dans les neurones immatures, la protéine tau est présente dans le corps cellulaire et les neurites mais avec la maturation neuronale, elle est majoritairement localisée dans les axones (Binder et al., 1985; Mandell & Banker, 1995). Cette maturation s'accompagne d'une expression des isoformes 4R, meilleures pour promouvoir l'assemblage des MT (Drubin et al., 1984).

La protéine tau est également exprimée dans le système nerveux périphérique (« big tau ») ainsi que dans les muscles, le rein, le pancréas, les testicules, les poumons ou encore le cœur, bien que les niveaux d'expression dans ces organes soient plus faibles que dans le SNC (Buee et al., 2000; Caillet-Boudin et al., 2015; Gu et al., 1996).

Enfin, l'expression des isoformes n'est pas conservée entre les espèces. Dans le cerveau de souris adulte, seules les isoformes 4R sont exprimées (Kosik et al., 1989). Une inversion d'expression des isoformes 3R et 4R se produit entre le 9^{ème} et le 18^{ème} jour post-natal. Dans le cerveau de poulet adulte, des isoformes 3R, 4R et 5R sont retrouvées (Yoshida & Goedert, 2002).

4. Fonctions physiologiques

D'abord décrite comme une protéine associée aux MT, permettant leur assemblage et leur stabilisation (Weingarten et al., 1975), la protéine tau est maintenant définie comme une protéine pléiotropique de par ses différentes fonctions selon sa localisation dans la cellule (T. Guo et al., 2017; Sotiropoulos et al., 2017) (figure 5).

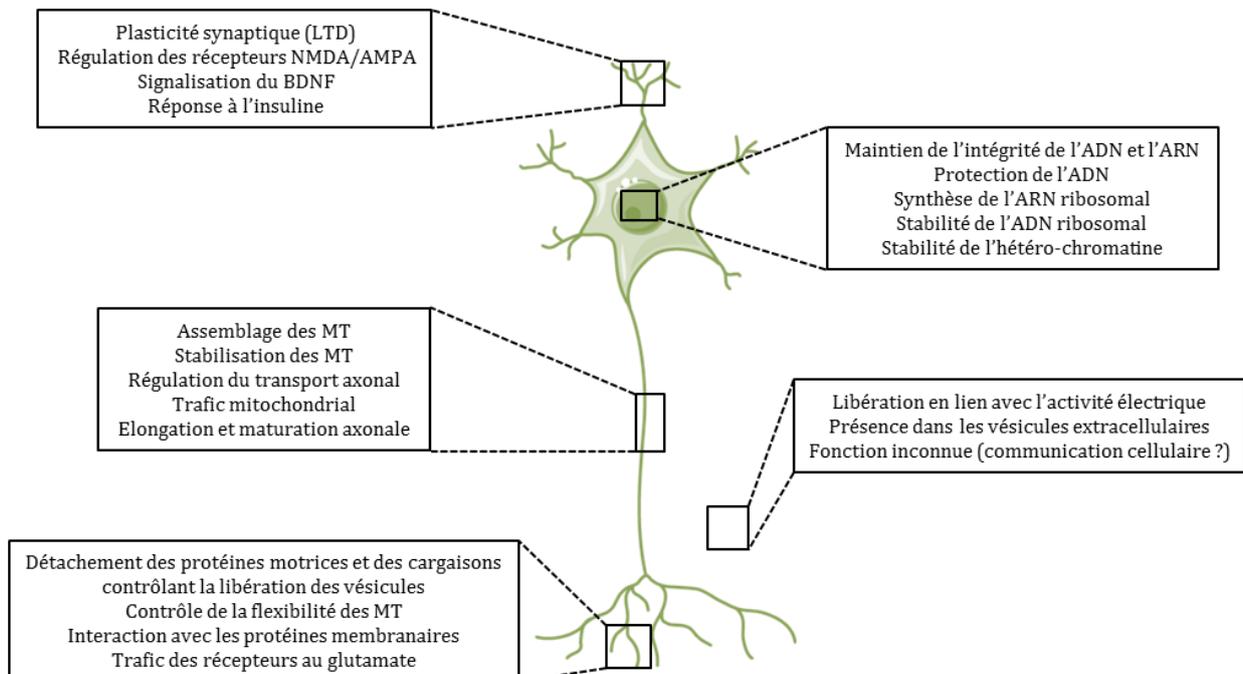


Figure 5 : Fonctions physiologiques de la protéine tau. Modifiée d'après Colin et al., 2020; T. Guo et al., 2017; Sotiropoulos et al., 2017.

Dans le neurone, la protéine tau est majoritairement présente dans les axones où elle se lie aux MT via ses domaines de répétition. Cependant, via sa partie N-terminale et sa partie riche en prolines, elle interagit avec des protéines membranaires (Arrasate et al., 2000; Brandt et al., 1995). C'est par exemple le cas avec la kinase Fyn présente au niveau des radeaux lipidiques. Leur interaction permet notamment d'initier la myélinisation des axones (Klein et al., 2002). Plus généralement, ces interactions permettent à la protéine tau d'être présente au niveau de la membrane plasmique et d'être impliquée dans des voies de signalisation cellulaire (Pooler & Hanger, 2010). Cependant, son association avec la membrane et ses conséquences ne sont pas encore bien comprises.

La protéine tau est également impliquée dans la régulation du transport axonal des protéines et des organites. Ce transport nécessite de l'énergie (ATP fournie par les mitochondries), des MT intacts ainsi que des protéines motrices comme la dynéine et la kinésine. Les dynéines transportent des cargaisons vers le corps cellulaire alors que les kinésines transportent des cargaisons vers les terminaisons axonales (Matamoros & Baas, 2016). La protéine tau est capable de modifier leur direction et leur fréquence de liaison avec les MT ralentissant à la fois les transports antérograde et rétrograde (Dixit et al., 2008; Seitz et al., 2002).

La protéine tau est également présente en faible quantité dans les dendrites (Ittner et al., 2010). Sa fonction n'est pas encore bien comprise mais elle pourrait être impliquée dans la plasticité synaptique via différents mécanismes comme la dépression à long-terme (Q. Chen et al., 2012; Kimura et al., 2014). Elle serait également impliquée dans la maturation morphologique des synapses des neurones granulaires de l'hippocampe ainsi que dans la mort sélective des neurones immatures en cas de stress important (Pallas-Bazarra et al., 2016).

Elle est également retrouvée dans le noyau (Loomis et al., 1990) où elle protégerait l'intégrité de l'ADN lors d'un stress thermique, ce dernier entraînant sa translocation du cytoplasme vers le noyau (Sultan et al., 2011). De plus, la protéine tau peut être impliquée non seulement dans la protection de l'ADN mais aussi dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Violet et al., 2014), bien que cela soit encore controversé (Rossi et al., 2013).

Enfin, la protéine tau est également impliquée dans la voie de signalisation de l'insuline dans le cerveau. Sa délétion chez la souris entraîne une altération de la réponse hippocampique à l'insuline et inhibe l'effet anorexigène de l'insuline provoquant des troubles métaboliques (Marciniak et al., 2017).

5. Vers la pathologie...

5.1. Modifications post-traductionnelles

La protéine tau subit de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) réparties sur toute sa longueur (**figure 6**) qui modifient sa structure et ses propriétés biochimiques aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques. La phosphorylation est la MPT la plus étudiée car elle régule négativement la capacité de tau à interagir avec les MT, elle est d'ailleurs très présente au cours du développement lors de la maturation des neurones (Goedert & Jakes, 1990; Llorens-Martin et al., 2012). La protéine tau possède 79 sites de phosphorylation supposés sur son isoforme la plus longue qui peuvent être modifiés par des

protéines kinases sur les sérines et les thréonines. Des phosphorylations ont également été rapportées sur des tyrosines (Williamson et al., 2002).

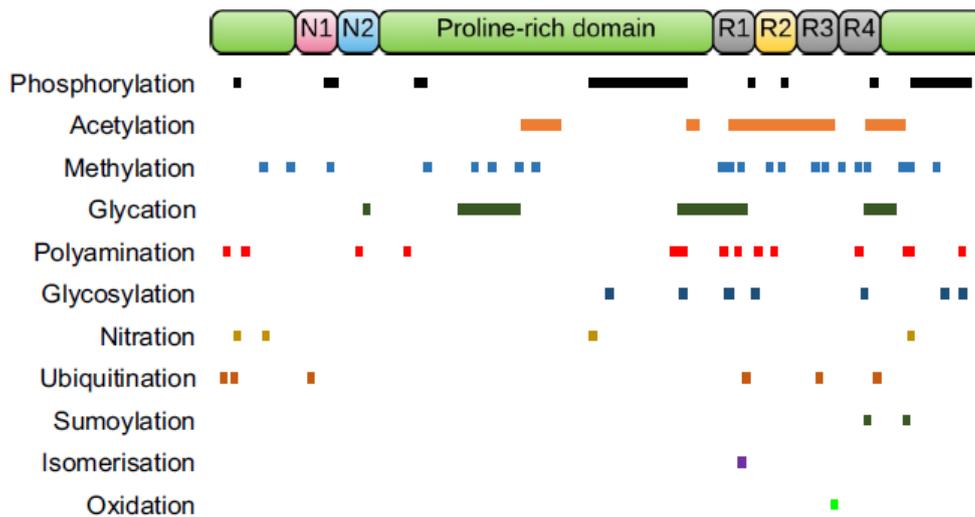


Figure 6 : Modifications post-traductionnelles de la protéine tau. Les barres colorées représentent approximativement les sites de chaque modification sur l'isoforme 2N4R. T. Guo et al., 2017.

La phosphorylation de tau dans des neurones matures va altérer son interaction avec les MT entraînant leur déstabilisation (Morris et al., 2015). Cela va avoir plusieurs conséquences à commencer par une altération du transport axonal (Zempel & Mandelkow, 2015). Les interactions de la protéine avec des complexes protéiques impliqués dans la transmission synaptique (Mondragón-Rodríguez et al., 2012) et avec des protéines membranaires sont également modulées par la phosphorylation (Arrasate et al., 2000). Cela entraîne une relocalisation de la protéine tau du compartiment axonal vers le compartiment somato-dendritique (Dotti et al., 1987). De plus, une augmentation de sa phosphorylation empêche sa translocation dans le noyau entraînant une augmentation des dommages à l'ADN induit par un stress oxydant (Frost et al., 2014; Violet et al., 2015).

5.2. Agrégation de la protéine tau

Des modifications de la conformation de la protéine tau peuvent conduire à son assemblage en structures amyloïdes. Ce sont des assemblages ordonnés de protéines riches en feuillets β . Deux hexapeptides présents dans les domaines de répétitions R2 et R3 respectivement nommé PHF6* ($^{275}\text{VQIINK}^{280}$) et PHF6 ($^{306}\text{VQIVYK}^{311}$) sont essentiels pour la formation de ces structures et sont présentes dans le cœur des agrégats (Bergen et al., 2000, 2001). PHF6* est présent dans la répétition codée par l'exon 10 donc uniquement dans les isoformes 4R ce qui les rend plus enclines à l'agrégation que les isoformes 3R. Lorsque la protéine tau est liée aux MT, PHF6 et PHF6* sont masqués (Kadavath et al., 2015) alors que lorsqu'elle s'en détache, ils sont relativement exposés. La dimérisation de la protéine tau peut se produire par des interactions entre deux PHF6, deux PHF6*, ou entre un PHF6 et un PHF6* (Peterson et al., 2008). Un recrutement supplémentaire de monomères et de dimères pourrait conduire à la formation d'un noyau oligomérique (processus de nucléation). L'oligomérisation se déroule en fonction de la concentration en protéines tau disponibles et du temps (Meraz-Ríos et

al., 2010). Les oligomères s'allongent en protomères qui adoptent une structure riche en feuillets β (Barghorn & Mandelkow, 2002). Des clivages enzymatiques de la protéine peuvent également promouvoir son agrégation, du moins *in vitro* (Cowan & Mudher, 2013). Ces agrégats fibrillaires sont la caractéristique lésionnelle de beaucoup de maladies neurodégénératives et conduisent à terme à la mort des neurones.

5.3. Lien entre modifications post-traductionnelles et agrégation ?

Les agrégats fibrillaires de protéines tau observés dans le cerveau de patients décédés sont décrits comme hyper- et anormalement phosphorylés (Grundke-Iqbal et al., 1986; Köpke et al., 1993). Il a donc été proposé que la dissociation de la protéine tau des MT peut-être due à sa phosphorylation, entraînant alors un changement de conformation, sa disponibilité en grande concentration et son auto-assemblage (Mandelkow & Mandelkow, 2012). Les données sur la phosphorylation de tau ont donc conduit à des interprétations largement acceptées aujourd'hui sur les liens entre l'hyperphosphorylation de la protéine tau et son agrégation. En pratique, des anticorps ciblant les formes phosphorylées sont utilisés pour mettre en évidence l'agrégation et la pathologie tau *in vitro* et *in vivo*. De plus, des traitements visant à réduire la phosphorylation ont été et sont encore développés (Fagiani et al., 2020; V. M.-Y. Lee et al., 2011). Pourtant, la cause réelle de l'agrégation de la protéine tau est encore inconnue. La phosphorylation pourrait être une conséquence à un changement de conformation de la protéine plus que la cause de son agrégation. Les avancées des techniques de spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence beaucoup de peptides phosphorylés sur la protéine tau native soluble (Drepper et al., 2020; Mair et al., 2016) et pas seulement sur les formes fibrillaires (Hanger et al., 2007). Les analyses dépendent notamment beaucoup de l'action des kinases et des phosphatases qui module la phosphorylation. De plus, les protéases et les phosphatases peuvent être incapables de dégrader ou de déphosphoryler la protéine tau agrégée du fait du masquage des sites phosphorylés, ce qui peut expliquer pourquoi tau est décrite comme hyperphosphorylée dans le cerveau des patients après autopsie. L'activité enzymatique dépend également du délai post-mortem, de la température et de l'énergie cellulaire. Ces nouvelles données invitent à reconsidérer le concept d'hyperphosphorylation pathologique de tau et à se questionner sur les éléments déclencheurs de l'agrégation.

Des cofacteurs ou d'autres MPT pourraient provoquer l'assemblage de la protéine dans le cerveau humain (Falcon, Zhang, Schweighauser, et al., 2018; Fichou et al., 2018). En effet, la protéine tau étant hydrophile, il n'est pas étonnant qu'elle ait besoin de cofacteurs tels que les glycosaminoglycanes sulfatés, les acides nucléiques ou les acides gras pour s'assembler en filaments (Goedert et al., 1996; Kampers et al., 1996; Pérez et al., 1996; Wilson & Binder, 1997). Ces cofacteurs, et notamment l'héparine, sont d'ailleurs utilisés pour induire l'agrégation de la protéine tau *in vitro*.

5.4. Perte de fonction normale ou gain de fonction toxique ?

En conditions pathologiques et lorsque que la protéine tau se détache des MT, elle est relocalisée du compartiment axonal vers le compartiment somato-dendritique ce qui entraîne des altérations au niveau de la synapse, du transport axonal et de la stabilité des MT (Hoover et al., 2010; Tashiro et al., 1997; Yuan et al., 2008; Zempel et al., 2010; Zempel & Mandelkow, 2015). Cela entraîne également une mauvaise localisation des cargaisons, telles que les mitochondries, les vésicules et les neurofilaments qui sont normalement transportés le long des

axones jusqu'aux terminaisons nerveuses. Il a été suggéré que le dysfonctionnement mitochondrial joue un rôle essentiel dans le développement de la pathologie tau (J. Yao et al., 2009).

Ces changements, ainsi que le processus d'agrégation de la protéine tau, ont un impact significatif sur la physiologie cellulaire et sur les fonctions de la protéine (figure 7). Ils peuvent être vus comme une perte de fonction et donc une « inactivation » de la protéine. Cependant, ils peuvent également être considérés comme un gain de fonction toxique car ils vont être responsables d'un grand nombre de changements fonctionnels dans la cellule qui causeront, à terme, la mort des neurones (Goedert, 2016).

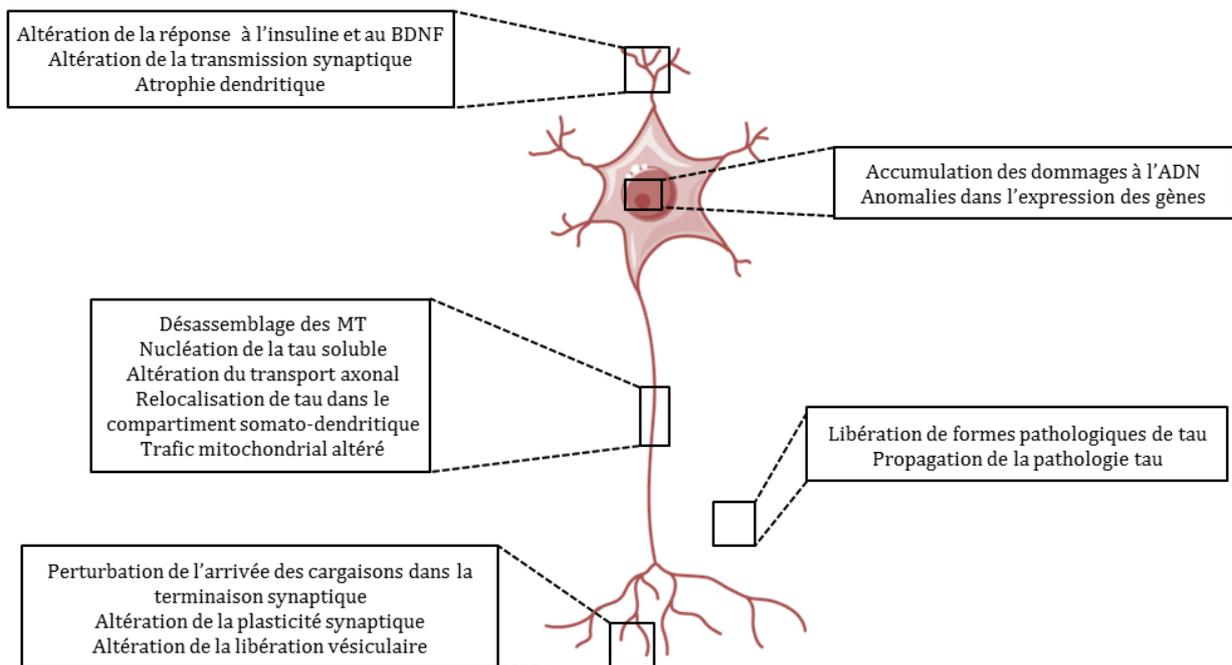


Figure 7 : Fonctions pathologiques de la protéine tau. Modifiée d'après Colin et al., 2020; T. Guo et al., 2017; Sotiropoulos et al., 2017.

II- Les tauopathies

Le terme « tauopathie » regroupe un ensemble de maladies neurodégénératives avec pour caractéristique commune une accumulation de protéines tau intracellulaires formant des agrégats fibrillaires insolubles. À ce jour, 27 tauopathies différentes ont été décrites comme par exemple la MA, la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence cortico-basale (DCB), la maladie de Pick (Pick), les FTDP-17 ou encore les encéphalopathies traumatiques chroniques (Arendt et al., 2016; Kovacs, 2018). Elles peuvent être classées en fonction des différentes isoformes retrouvées au sein des agrégats : 3R, 4R ou les deux (tableau 1).

Tableau 1 : Liste non exhaustive des tauopathies. Elles sont classées selon les isoformes 3R et/ou 4R de tau retrouvées au sein des agrégats.

3R + 4R
Maladie d'Alzheimer (MA) Encéphalopathie traumatique chronique Tauopathie primaire liée à l'âge Syndrome de Down Maladie de Niemann-Pick de type C Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker Démence familiale de type britannique Démence familiale de type danoise Maladie du hochement de tête Syndrome Parkinsonien post-encéphalitique Syndrome de Guam FTDP-17 avec certaines mutations MAPT comme V337M et R406W
3R
Maladie de Pick FTDP-17 avec certaines mutations MAPT comme G272V et Q336R
4R
Paralyse supranucléaire progressive (PSP) Démence à grains argyrophiles Dégénérescence cortico-basale (DCB) Astrogliopathie liée à l'âge Syndrome parkinsonien atypique de Guadeloupe Tauopathie hippocampale Maladie de Huntington FTDP-17 avec certaines mutations MAPT comme P301L et P301S

Dans ce travail de thèse, nous avons sélectionné une tauopathie 3R+4R (MA), une tauopathie 3R (Pick) et une tauopathie 4R (PSP) pour lesquelles le cerveau de plusieurs patients était disponible dans la Neurobanque de Lille. Dans la suite de l'introduction, nous focaliserons donc notre attention sur ces 3 tauopathies. Nous verrons que malgré leur caractéristique commune, elles diffèrent en de nombreux points. L'hétérogénéité clinique et lésionnelle ainsi que l'évolution spatio-temporelle des lésions seront évoquées.

1. Étiologie

1.1. Les tauopathies sporadiques

La plupart des tauopathies sont dites sporadiques (par opposition à épidémiques), c'est-à-dire qu'elles touchent quelques individus de façon isolée. Les causes sont rarement identifiées à l'exception de quelques tauopathies. Par exemple, l'encéphalopathie traumatique chronique est causée par de multiples lésions cérébrales suite à des traumatismes crâniens comme chez les boxeurs ou les joueurs de football américain (Orr et al., 2017). Le syndrome parkinsonien atypique de Guadeloupe et le syndrome de Guam sont liés à la consommation de plantes locales toxiques (Lannuzel et al., 2002). Le syndrome parkinsonien post-encéphalitique pourrait survenir suite à une infection virale (Jang et al., 2009). Néanmoins, la plupart du temps, les causes ne sont pas clairement identifiées et il s'agit bien souvent d'une combinaison de facteurs de risque environnementaux et génétiques.

Le premier facteur de risque dans les maladies neurodégénératives est l'âge. Ces maladies sont différentes du vieillissement normal qui entraîne dans tous les cas un ralentissement des fonctions cognitives. Une composante génétique, en dehors de toute mutation, existe également dans le risque de développer la MA. En effet, les antécédents familiaux de parents proches affectés ne sont pas inhabituels et ils augmentent le risque de survenue de la MA. De plus, l'étude du génome humain a permis de mettre en évidence des gènes associés à un risque plus élevé de développer la MA ainsi que d'autres maladies neurodégénératives (Robinson et al., 2018). Le plus connu est le gène de l'apolipoprotéine E (Corder et al., 1993; Van Cauwenberghe et al., 2016). L'apolipoprotéine E (APOE) est impliquée dans le transport des lipides. Les personnes porteuses de l'allèle $\epsilon 4$ ont 3 à 4 fois plus de risque de développer la MA et celles ayant deux copies de cet allèle (homozygote) voient leur risque multiplié par 15. À l'inverse, celles portant l'allèle $\epsilon 2$ ont un risque diminué de plus de moitié. Près de 30 autres gènes, dont TREM2, ADAM10 ou encore PLD3, ont été identifiés comme des facteurs de risque génétiques grâce à des études d'association pangénomique (GWAS) (Jansen et al., 2019). Ils peuvent affecter directement les protéines tau et APP mais ils modulent également le métabolisme du cholestérol, l'endocytose et la réponse immunitaire.

Des facteurs de risque environnementaux, donc potentiellement modifiables, sont également liés au développement de la MA. C'est notamment le cas du diabète, de l'hypertension à mi-vie, de l'obésité à mi-vie, de l'inactivité physique, de la sédentarité, des microtraumatismes crâniens, des anesthésies répétées, des troubles du sommeil, de la dépression, du tabagisme et d'un faible niveau d'éducation (Galvin, 2017; Norton et al., 2014). Ces facteurs de risque sont communs à beaucoup d'autres maladies notamment les maladies cardiovasculaires. Stimuler son cerveau grâce à diverses activités, avoir une vie sociale active, pratiquer une activité physique et avoir une alimentation saine contribuent à limiter les risques de maladies de manière globale ou du moins à retarder leur apparition (Ngandu et al., 2015).

1.2. Les tauopathies génétiques

Certaines tauopathies peuvent être causées par des mutations génétiques. C'est notamment le cas des formes familiales de MA qui sont causées par des mutations autosomiques dominantes présentes sur 3 gènes : le gène de l'APP sur le chromosome 21, le gène de la préséniline 1 (PSEN1) sur le chromosome 14 et le gène de la préséniline 2 (PSEN2) sur le chromosome 1 (D. L. Price & Sisodia, 1998). À l'heure actuelle, plus de 230 mutations ont été identifiées. Celles de PSEN1 sont les plus fréquentes, c'était d'ailleurs la cause de la MA d'Auguste D., la patiente du Dr. Alzheimer (Müller et al., 2013). Les mutations affectent la synthèse et la protéolyse de l'APP, qui conduisent à une production excessive de peptides A β (L. Wu et al., 2012). Elles représentent environ 1% des cas de MA et sont majoritairement des formes à début précoce (Cacace et al., 2016) qui peuvent se présenter dès l'âge de 20 ans, avec un âge moyen de début de maladie de 46 ans (Ryman et al., 2014). Comparées aux formes sporadiques de MA, les formes familiales présentent non seulement un âge de début souvent plus précoce mais aussi divers symptômes non cognitifs et une évolution plus agressive. Il existe aussi une hétérogénéité phénotypique marquée entre les différentes mutations. Cependant, sur d'autres aspects, les deux formes sont comparables notamment au niveau de la morphologie et de la composition des inclusions de protéines tau mais aussi au niveau du profil des biomarqueurs dans le liquide cébrospinal (LCS) (Lista et al., 2015).

Les démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (FTDP-17) sont des tauopathies génétiques héréditaires liées à des mutations autosomiques dominantes du gène MAPT (Foster et al., 1997; Hutton et al., 1998; Ingram & Spillantini, 2002; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998; Wilhelmsen et al., 1994). Depuis peu, elles sont considérées comme un sous-type de formes familiales de démences fronto-temporales (DFT) et non plus comme une entité à part entière (Forrest et al., 2018). Plus de 60 mutations du gène MAPT ont été identifiées dans un grand nombre de familles avec FTDP-17 (Shafei et al., 2020). Les mutations MAPT comptent pour approximativement 5% des cas de démences fronto-temporales et sont concentrées dans les exons 9 à 12 (**figure 8**). Certaines mutations ont pour conséquence une diminution de l'interaction de la protéine tau avec les MT et favorisent donc son assemblage en filaments (Barghorn et al., 2000; Hasegawa et al., 1998; Hong et al., 1998; Rossi et al., 2013). D'autres mutations comme la P301L ou la P301S situées dans l'exon 10 augmentent la propension à former des feuillettes β favorisant l'agrégation de la protéine tau (Lewis et al., 2000). De ce fait, elles sont beaucoup utilisées dans les modèles cellulaires et animaux de tauopathies pour mimer la pathologie tau et la neurodégénérescence (de Calignon et al., 2012; Dujardin et al., 2015; Holmes et al., 2014; Iba et al., 2013; Liu et al., 2012). Chez la souris, cela permet d'induire la formation rapide et agressive d'une pathologie tau, qui n'est jamais présente chez la souris sauvage même très âgée. Cela est assez cohérent avec le fait que dans les tauopathies sporadiques, les lésions tau mettent des années à se former. Les modèles permettent donc d'étudier la formation des lésions tau et leurs conséquences même si l'on peut se questionner sur leur pertinence dans l'étude des tauopathies sporadiques.

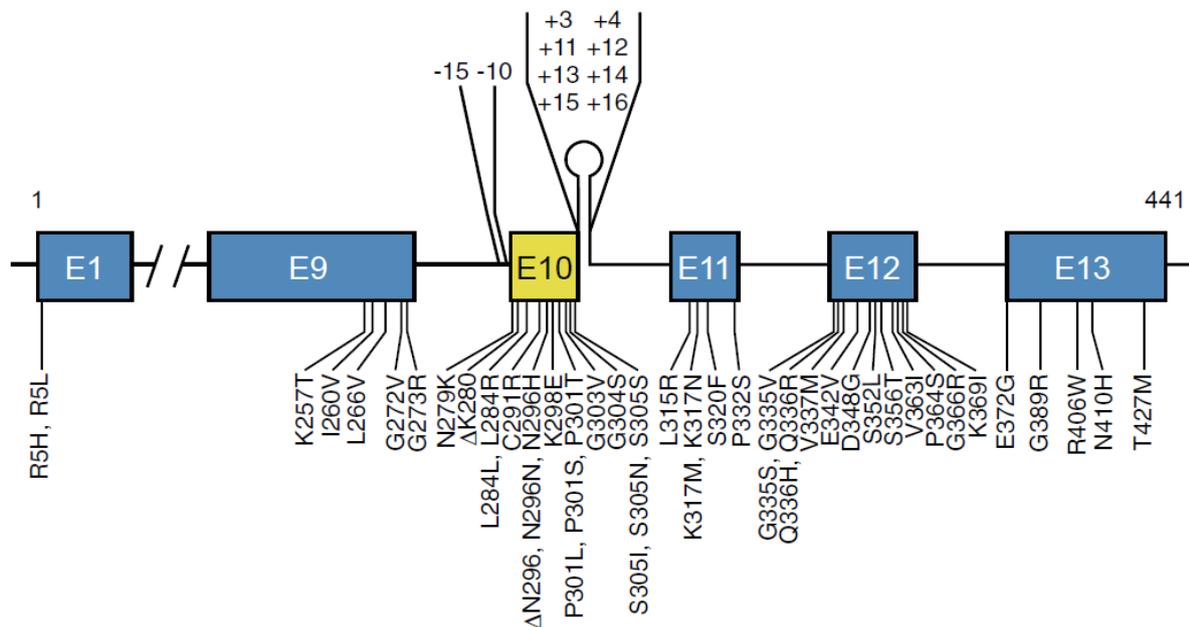


Figure 8 : Mutations de MAPT dans les FTDP-17. Seulement 47 mutations exoniques et 10 mutations introniques sont représentées ici. Michel Goedert, 2016.

2. Hétérogénéité clinique inter- et intra- tauopathies

2.1. La maladie d'Alzheimer

La MA représente 60 à 80% des cas de démence. En France, le nombre de patients est estimé à 1,3 millions (www.inserm.fr) et ce nombre ne cesse d'augmenter avec l'augmentation de l'espérance de vie et le vieillissement général de la population. La MA touche davantage les femmes que les hommes de plus de 65 ans avec 15% de la population atteinte à 80 ans. Environ 5% des cas de MA sont dits à début précoce quand ils sont diagnostiqués avant 65 ans, ce sont souvent des formes familiales de MA.

Les signes les plus évocateurs sont les pertes de mémoire ainsi que les troubles des fonctions exécutives (planification, exécution, flexibilité, inhibition) et une désorientation spatio-temporelle. Par exemple, les patients ne savent plus comment se servir de leur machine à café ni comment se rendre dans un endroit qu'ils connaissaient pourtant bien. Ces troubles sont bien souvent compensés par les proches et peuvent ainsi passer inaperçus au début de la maladie. Lors de la consultation, les tests neuropsychologiques peuvent mettre en évidence leur caractère pathologique. Avec l'évolution de la maladie, le déclin cognitif est de plus en plus important et de nouveaux symptômes apparaissent comme une aphasie, une apraxie, des troubles du comportement et de l'humeur (dépression, anxiété, irritabilité) et des troubles du sommeil. À terme, la maladie conduit à une perte d'autonomie. Néanmoins, l'évolution clinique est extrêmement variable selon les patients. Les symptômes ne sont pas tous présents et n'apparaissent pas nécessairement dans le même ordre. De plus, des phénotypes atypiques de MA existent, notamment dans les cas à début précoce où l'évolution est souvent plus agressive (Koedam et al., 2010; Mendez, 2017).

Les formes atypiques de MA les plus communes sont le variant frontal (Ossenkoppele et al., 2015), l'atrophie corticale postérieure (Crutch et al., 2012) et l'aphasie primaire progressive (Mesulam et al., 2008). Elles concernent un tiers des patients avec un début précoce et seulement 6% des patients avec un début tardif (Graff-Radford et al., 2021). Le variant frontal entraîne des troubles du comportement (désinhibition, apathie, troubles alimentaires) et des fonctions exécutives. Il représente environ 2% des cas de MA et il est souvent diagnostiqué à tort comme une démence fronto-temporale ou une démence vasculaire. L'atrophie corticale postérieure se caractérise par un déclin progressif des compétences visuo-spatiales, visuo-perceptuelles et praxiques liées à une dégénérescence progressive des lobes occipital, pariétal et occipito-temporal. Le cortex visuel, au niveau du lobe occipital, est touché en premier d'où les troubles visuels qui entraînent des problèmes de lecture, d'orthographe, d'écriture et d'orientation spatiale jusqu'à parfois causer une cécité. L'aphasie primaire progressive entraîne des troubles du langage avec notamment une difficulté à trouver ses mots et une perte du sens des mots. Dans ces formes, le diagnostic est compliqué car les troubles comportementaux, visuels ou langagiers ne sont pas évocateurs d'une MA typique.

2.2. La paralysie supranucléaire progressive

La PSP, ou maladie de Steele-Richardson-Olszewski, a été identifiée comme une maladie à part entière en 1963 par les trois médecins qui lui ont donné son nom (Richardson et al., 1963). C'est une maladie rare avec une prévalence de 1 à 5 patients pour 100 000 habitants selon les sources mais ce chiffre pourrait être bien inférieur à la réalité notamment car il est

difficile de faire le diagnostic. Il n'est d'ailleurs posé de façon certaine qu'après une analyse histologique du cerveau du patient, comme pour toutes les tauopathies actuellement. La PSP se déclare souvent entre 55 et 70 ans et à tendance à toucher davantage les hommes (www.pspfrance.org).

Elle fait partie des syndromes parkinsoniens atypiques dont le symptôme le plus évocateur est la perte d'équilibre lors de la marche qui entraîne des chutes (Josephs, 2017). À terme, cela rend la marche difficile voire impossible. À cela s'ajoute une bradykinésie, une dysarthrie, une rigidité dystonique et des problèmes visuels comme une aimantation du regard lié à la paralysie des muscles oculaires (Steele et al., 2014). Il est également fréquent d'observer une modification du comportement qui se manifeste souvent par une impulsivité et une apathie faisant penser à une dépression ainsi qu'un syndrome dyséxecutif et un ralentissement intellectuel. Plus tardivement, des troubles de la déglutition entraînant des fausses routes peuvent conduire au décès. Tout comme pour la MA, les premiers signes de la PSP peuvent être très variables (Dickson et al., 2010). En fonction des premiers symptômes, plusieurs formes de PSP sont définies : la PSP classique ou syndrome de Richardson, la PSP avec parkinsonisme, la PSP avec syndrome corticobasal, la PSP akinésique, la PSP ataxique, la PSP avec dysfonctionnement oculaire moteur prédominant, la PSP avec instabilité posturale prédominante ou bien encore la PSP avec présentation frontale, indistinguable de la démence fronto-temporale (Höglinger et al., 2017). Toutefois, malgré ces différents phénotypes cliniques, les patients finiront quasiment tous avec un trouble de la marche important causant des chutes fréquentes, des troubles du mouvement des yeux, de la parole, de la déglutition et des troubles cognitifs. Tous les symptômes sont liés à une paralysie progressive due à une évolution des lésions en particulier dans le tronc cérébral et les ganglions de la base. Le tronc cérébral régule les fonctions vitales telles que la respiration, le rythme cardiaque et la déglutition. Il joue aussi un rôle dans l'ajustement de la posture. Les ganglions de la base, aussi appelés noyaux gris centraux ou noyaux de la base, sont impliqués dans l'initiation et l'harmonisation des mouvements volontaires et coordonnent les changements de posture.

La PSP est une maladie mal diagnostiquée car mal connue. Les symptômes font penser à d'autres pathologies, du moins au début, comme à la maladie de Parkinson, à l'atrophie multi-systématisée ou encore à la dégénérescence cortico-basale (DCB). Comparée à la maladie de Parkinson, la PSP évolue plus rapidement provoquant des chutes plus tôt et donnant lieu à une rigidité musculaire et un handicap plus graves, généralement dans un délai plus court. C'est avec l'évolution clinique que le diagnostic s'oriente vers une PSP.

2.3. Des démences fronto-temporales à la maladie de Pick

Les démences fronto-temporales (DFT) ont été décrites pour la première fois par Arnold Pick à la fin du XIX^{ème} (Pick, 1892). Il donna le nom de « corps de Pick » aux inclusions observées dans ces atrophies fronto-temporales (Derouesné, 2014). Dans 90% des cas, les DFT débutent entre 45 et 60 ans et touchent aussi bien les hommes que les femmes. Elles représentent environ 20% des démences et touche de 10 à 15 personnes pour 100 000 habitants. La survie est en moyenne de 5 ans (www.academie-medecine.fr). Aujourd'hui, les DFT regroupent un ensemble de démences dont la maladie de Pick fait partie. Elles diffèrent par leur étiologie et les lésions observables en histologie. Environ 40% des DFT sont des tauopathies. La maladie de Pick est une forme rare de tauopathie de type DFT.

Sur le plan clinique, les DFT sont indistinguables les unes des autres (Neary et al., 1998). Les lobes frontal et temporal sont impliqués principalement dans le comportement, la personnalité, le langage et les fonctions exécutives. Selon la région touchée, les symptômes seront différents. Aujourd'hui, les DFT sont classifiées en trois syndromes (Karageorgiou & Miller, 2014) :

- La DFT comportementale. Elle entraîne des changements dans la personnalité et le comportement du patient qui deviennent inappropriés (désinhibition, vulgarité, impulsivité, compulsivité, négligence corporelle, stéréotypies). Il est également fréquent d'observer une apathie et un repli sur soi. En début de maladie, elle est souvent confondue avec des maladies psychiatriques comme la bipolarité ou la dépression.
- L'aphasie primaire progressive non-fluente. Les symptômes touchent le langage. Les patients vont avoir du mal à s'exprimer (élocution difficile, agrammatisme, apraxie de la parole) ce qui entraîne souvent une réduction de la parole.
- L'aphasie primaire progressive sémantique. Elle se caractérise par une perte de la connaissance du sens des mots et plus globalement par une perte des connaissances sémantiques.

Ces syndromes s'accompagnent tous d'un déclin cognitif.

3. Hétérogénéité lésionnelle

3.1. Inclusions de protéines tau

Selon les tauopathies, les inclusions formées de protéines tau ne sont pas composées des mêmes isoformes (Buée et al., 2000). Elles n'ont pas la même morphologie et n'affectent pas les mêmes types cellulaires (**figure 9**).

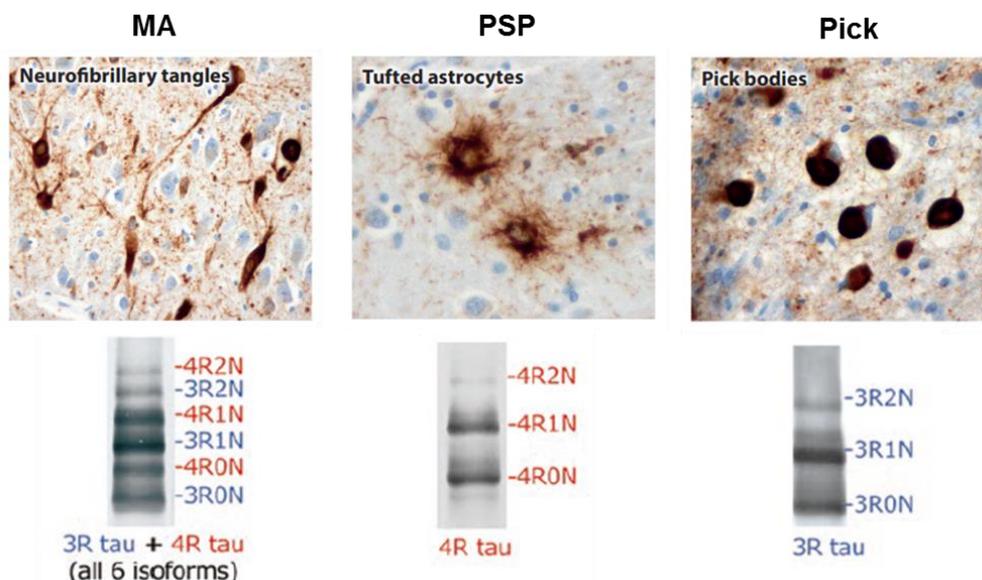


Figure 9 : Morphologie et composition en isoformes de tau des inclusions observées dans différentes tauopathies. Les dégénérescences neurofibrillaires et les corps de Pick sont présents dans les neurones alors que les touffes astrocytaires sont présentes dans les astrocytes. Un western-blot avec un anticorps anti-tau permet de mettre en évidence les isoformes présentes dans les fractions insolubles. Modifiée d'après Götz et al., 2019; Masato Hasegawa, 2019.

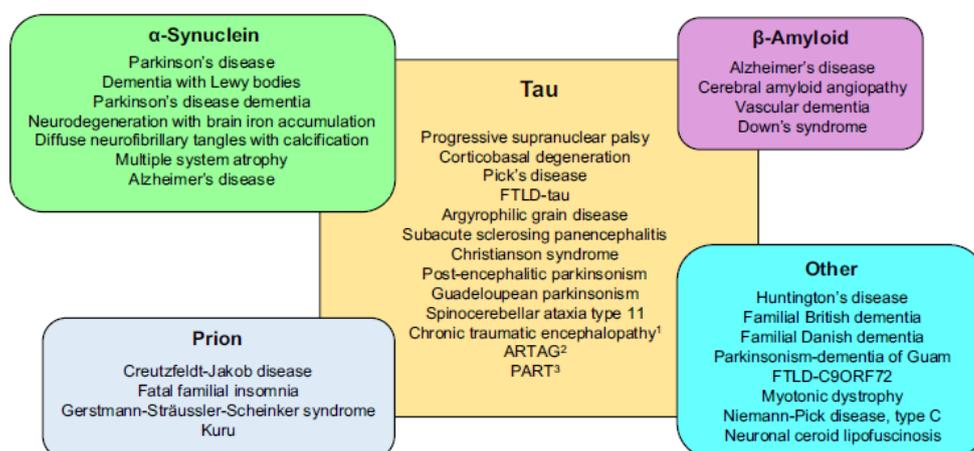
Dans la MA, les 6 isoformes de la protéine tau (3R et 4R) s'accumulent au sein d'inclusions appelées dégénérescences neurofibrillaires (DNF) présentes dans le corps cellulaire des neurones, et fils de neuropile (NT pour *neuropil threads*) présents dans leur prolongements. Des études ultrastructurelles en microscopie électronique ont permis de révéler que les composants majoritaires des DNF sont des filaments appariés en hélice (PHF pour *paired helical filament*) et des filaments droits (SF pour *straight filament*) (Kidd, 1963). Les PHF sont composés de deux filaments d'environ 10 nm de diamètre qui s'enroulent l'un autour de l'autre formant des structures périodiques de 80 nm. Les SF ont une largeur semblable mais n'ont pas cette périodicité en hélice (Crowther, 1991; Kidd, 1963).

Dans la PSP, ce sont les isoformes 4R de tau qui s'accumulent au sein de DNF et de NT dans les neurones (Hauw et al., 1994; Litvan et al., 1996; N. J. Pollock et al., 1986), en touffes astrocytaires dans les astrocytes (Dickson, 1999; Hauw et al., 1994) et en corps enroulés dans les oligodendrocytes (Hauw et al., 1990; T. Yamada et al., 1992). Contrairement à la MA, l'analyse ultrastructurelle des DNF a montré la présence de filaments droits de 15 à 18 nm et des filaments avec une longue périodicité ont également été observés (Roy et al., 1974; Tellez-Nagel & Wiśniewski, 1973).

Dans la maladie de Pick, ce sont les isoformes 3R qui s'accumulent au sein d'inclusions sphériques appelées corps de Pick présentes dans le corps cellulaire des neurones (Constantinidis et al., 1974; Feany et al., 1996; N. J. Pollock et al., 1986). D'un point de vue ultrastructurel, les corps de Pick sont composés d'un mélange de filaments larges et droits et de larges filaments torsadés avec une longue périodicité (Munoz-Garcia & Ludwin, 1984; Murayama et al., 1990).

3.2. Autres inclusions protéiques

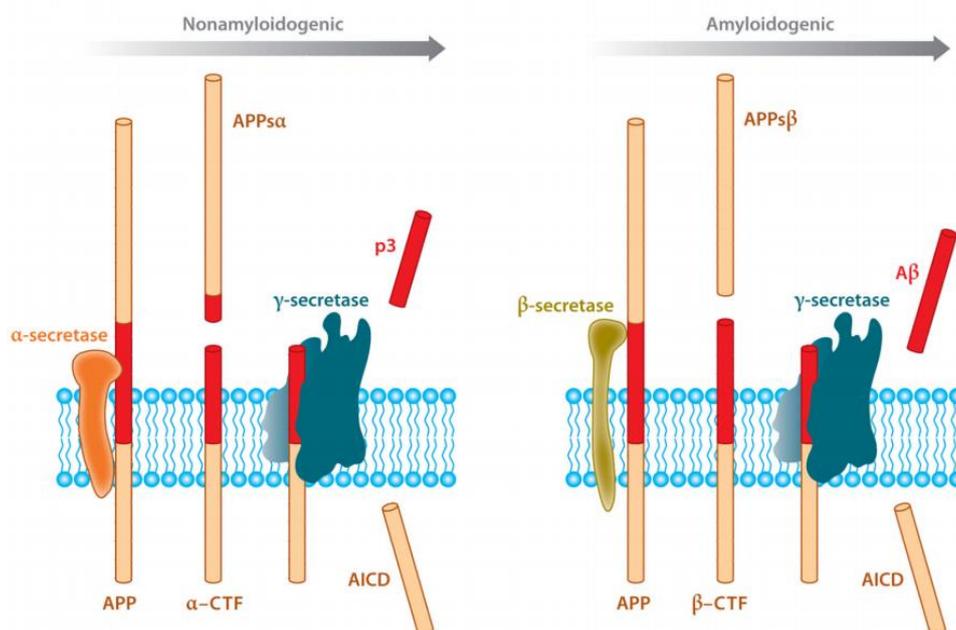
Le principal facteur de risque des maladies neurodégénératives est l'âge. Sans grande surprise, il a donc été démontré que jusqu'à 55% des personnes âgées qui subissent un examen post-mortem ont des pathologies associées à plus d'une maladie neurodégénérative (**figure 10**) (Kovacs et al., 2008; Schneider et al., 2007). Dans les tauopathies, il est donc fréquent d'observer des inclusions de protéines TDP-43 ou d' α -synucléine, des corps de Lewy, des microhémorragies ou encore de l'athérosclérose. Cela pourrait influencer les mécanismes physiopathologiques et la sévérité des tauopathies. Il a notamment été démontré que l' α -synucléine initie la polymérisation de la protéine tau hyperphosphorylée *in vitro* (Giasson et al., 2003).



(figure page précédente)

Figure 10 : Schéma illustrant le large éventail de pathologies dans lesquelles les inclusions tau sont accompagnées de dépôts d'autres protéines couramment associées à d'autres maladies. T. Guo et al., 2017.

Dans la MA, la présence de dépôts insolubles de peptides A β (notamment A β 40 et A β 42) dans l'espace extracellulaire est inhérente à la maladie. La protéine APP, présente à la surface cellulaire, peut être clivée par l' α - puis la γ -sécrétase ce qui génère le peptide p3 en extracellulaire. Cette voie est dite non-amyloïdogénique. L'autre voie, dite amyloïdogénique, implique un clivage de l'APP par la β -sécrétase (BACE1) puis la γ -sécrétase, conduisant à la génération des peptides A β dans le milieu extracellulaire. Les deux voies génèrent également peptides extracellulaires solubles (sAPP α et sAPP β) et des fragments C-terminaux intracellulaires identiques (AICD) (Tan & Gleeson, 2019) (figure 11). Un déséquilibre dans les voies de production et de clairance des peptides A β conduit à leur accumulation sous forme de plaques. A β 42 est le plus propice à former des structures amyloïdes. Au cours de la MA, les lésions tau et A β se développent en suivant des voies spatio-temporelles différentes. Pour les plaques A β , 5 stades de progression ont été décrits, touchant d'abord le néocortex puis les régions cérébrales allocorticales, les noyaux du diencephale, le striatum et les noyaux cholinergiques, plusieurs noyaux du tronc cérébral et enfin le cervelet (Thal et al., 2002). Le lien entre les deux pathologies n'est pas clair. Chez l'Homme, il a été montré que la capacité de tau à former des agrégats était augmentée chez les patients qui avaient des plaques A β (Bennett et al., 2017). Une étude *in vivo* montre que lorsque des agrégats de tau sont injectés dans le cerveau de souris transgéniques développant des plaques A β , l'agrégation de tau augmente en lien avec la présence d'A β (He et al., 2018). Dans plusieurs modèles de souris transgéniques développant les deux pathologies, la pathologie tau est exacerbée et sa propagation est plus importante en présence d'A β (Bennett et al., 2017; Clayton et al., 2021; Gomes et al., 2019; He et al., 2018; G. A. Rodriguez et al., 2020). Cela pourrait être lié au fait qu'A β entraîne une hyperexcitabilité neuronale (G. A. Rodriguez et al., 2020) qui elle-même entraîne une augmentation de la sécrétion de tau (Pooler et al., 2013). Néanmoins, pour le moment, les mécanismes qui permettent à A β de potentialiser la pathologie tau ne sont pas encore élucidés.



(figure page précédente)

Figure 11 : Clivages de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). Dans la voie de traitement non amyloïdogénique, l'APP est d'abord protéolysé par l' α -sécrétase dans le domaine amyloïde- β ($A\beta$) pour générer l'ectodomaine APP, APPs α et le fragment C-terminal, α -CTF (C83). Le clivage subséquent de α -CTF par la γ -sécrétase produit p3 et AICD. Dans la voie amyloïdogénique, la β -sécrétase (BACE1), clive l'APP à l'interface du domaine $A\beta$ et du domaine extracellulaire de l'APP pour générer APPs β et β -CTF (C99). Il est ensuite protéolysé par la γ -sécrétase pour libérer les peptides $A\beta$ (dont les plus communs : $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$) et l'AICD. O'Brien & Wong, 2011.

Ces comorbidités conduisent à une hétérogénéité plus grande des maladies et à des tableaux cliniques parfois complexes qui rendent le diagnostic difficile. Identifier leur présence aura des implications dans la conception de cibles thérapeutiques efficaces. Premièrement, cela permettra la stratification correcte des patients dans des groupes ayant des caractéristiques similaires, ce qui renforcera le résultat des essais cliniques. Deuxièmement, l'identification de pathologies concomitantes (même cliniquement silencieuse) et la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des lésions pourront permettre le développement de traitements personnalisés pour les patients affectés par des maladies neurodégénératives associées. Malheureusement, la présence de ces comorbidités n'est jamais prise en compte dans les modèles expérimentaux du fait de la difficulté à les mettre en place et la complexité d'analyse qui en résulterait. Cependant, cela pourrait expliquer les échecs de certains essais thérapeutiques ou le fait que certaines personnes répondent mieux aux traitements que d'autres.

4. Hétérogénéité de progression spatio-temporelle des lésions

Selon les tauopathies, les inclusions de protéines tau apparaissent dans une région bien précise puis s'étendent progressivement à d'autres régions selon des voies anatomiques particulières (**figure 12**). Une progression stéréotypée des lésions a notamment été établie pour la MA en 1991 (Braak & Braak, 1991). Une progression de la pathologie tau a également été décrite dans la PSP (Verny et al., 1996; Williams et al., 2007), la maladie des grains argyrophiles (Saito et al., 2004), et plus récemment la maladie de Pick (Irwin et al., 2016).

Dans la MA, 6 stades de progression de la pathologie tau ont été définis et sont appelés stade de Braak (Braak & Braak, 1991). Les inclusions de tau apparaissent d'abord dans le cortex transentorhinal et la couche II du cortex entorhinal (Braak I). Les neurones de cette couche se projettent via la voie perforante vers des sous-régions de l'hippocampe dont la corne d'Ammon 1 (CA1) qui est alors atteinte (Braak II). Ensuite, les DNF apparaissent dans les structures limbiques du subiculum et du néocortex temporal inférieur dans des aires associatives (Braak III), puis dans l'amygdale et le thalamus (Braak IV) se répandant enfin dans le néocortex dans des régions sensorielles, motrices et visuelles primaires (Braak V-IV). L'histopathologie post-mortem a révélé que la pathologie tau est étroitement liée à la perte neuronale visible d'abord dans le cortex entorhinal puis dans l'hippocampe et dans le néocortex (Arriagada et al., 1992; Gómez-Isla et al., 1997; J. L. Price et al., 1991). Ces stades de progression ont récemment été

confirmés par des études en TEP (Hoenig et al., 2018; Johnson et al., 2016; Schwarz et al., 2016) et sont fortement corrélés au déclin cognitif (Giannakopoulos et al., 2003).

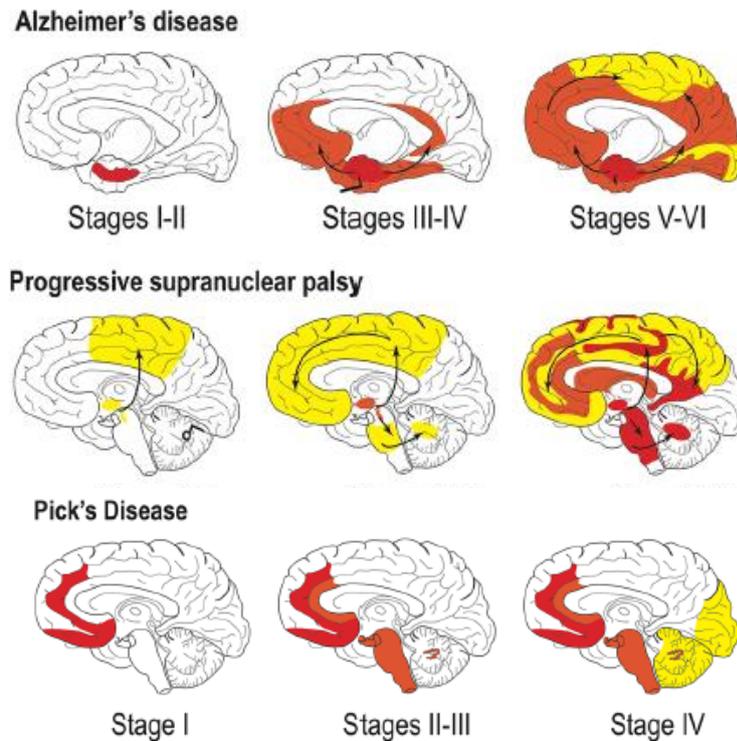


Figure 12 : Stades de progression de la pathologie tau dans la MA, la PSP et Pick. Colin et al., 2020.

Les premiers symptômes apparaissent souvent à partir du stade de Braak III alors que la pathologie tau s'est déjà installée et propagée lentement depuis plusieurs années. En 2011, des travaux soulignent cette apparition précoce en décrivant un stade qui précéderait l'apparition des DNF appelé stade de « pré-tangles » (Braak et al., 2011; Braak & Del Tredici, 2011). À ce stade, une accumulation de protéines tau hyperphosphorylées sans formation de structures fibrillaires insolubles apparaît dans le tronc cérébral et notamment dans le locus coeruleus chez des sujets très jeunes (entre 10 et 30 ans) en absence d'accumulation de peptides $A\beta$. Ce stade pourrait être le début de la MA bien qu'en absence d'études longitudinales du vivant des patients il n'est pas possible de savoir si ces sujets auraient développés une MA, d'autant que cette accumulation est présente chez quasiment tous les cerveaux analysés et que l'hyperphosphorylation de tau n'est pas forcément irréversible (Duyckaerts, 2011).

Toutefois, avec les données récentes de neuroimagerie, les conclusions de 1991 sont à nuancer selon le sous-type de MA (Ossenkoppelle et al., 2020; Poulakis et al., 2018). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) anatomique a permis d'observer des différences d'atrophie de la substance grise selon les phénotypes cliniques (Whitwell et al., 2012) faisant ainsi le parallèle entre les régions en dégénérescence et les symptômes cliniques. Aujourd'hui, 4 sous-types de MA sont mis en évidence selon la répartition spatio-temporelle des lésions tau (**figure 13**) et l'atrophie cérébrale : typique (atrophie hippocampique et corticale associative), limbique prédominante, épargnant l'hippocampe et avec atrophie minimale. Ils représentent respectivement 55%, 21%, 17% et 15% des cas (Ferreira et al., 2020). Les phénotypes cliniques atypiques de MA, c'est-à-dire ceux non amnésiques, sont plus fréquents dans le sous-type épargnant l'hippocampe que dans le sous-type classique (38% contre 11%) (Hanna Al-Shaikh et

al., 2020). La répartition des DNF est donc en lien avec les symptômes. Par exemple, dans l'atrophie corticale postérieure, les DNF sont plus abondantes dans le cortex visuel primaire que dans l'hippocampe (Tang-Wai et al., 2004). De même dans l'aphasie primaire progressive due à la MA, la pathologie tau est observée principalement dans les structures temporo-pariétales (Giannini et al., 2017). Selon le sous-type, l'âge de début de la maladie, le niveau d'éducation, l'état cognitif global, la durée de la maladie, le génotype APOE et les biomarqueurs dans le LCS diffèrent (Habes et al., 2020; Murray et al., 2011). Ces sous-types et leur pourcentage de répartition diffèrent selon les études et évoluent encore avec l'évolution des techniques d'imagerie et le nombre de cas pris en compte (Levin et al., 2020; Vogel et al., 2021). Mais, quoi qu'il en soit, ils soulignent l'hétérogénéité au sein de l'entité clinique de MA et permettent de mieux comprendre les différents phénotypes cliniques, en lien avec les différences de progression spatio-temporelle des lésions.

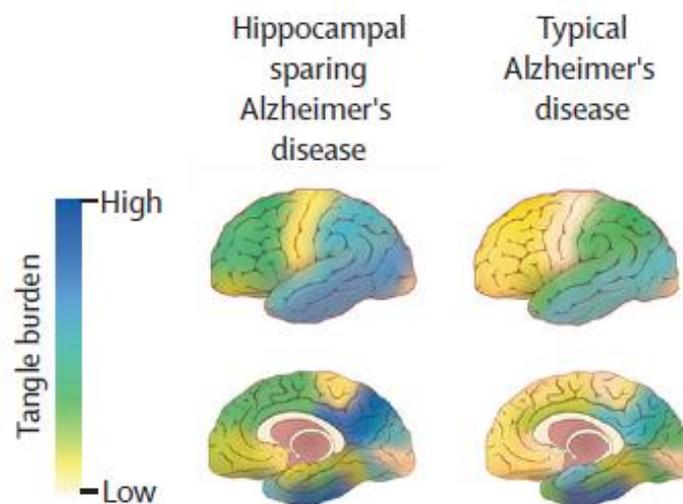


Figure 13 : Hétérogénéité de la distribution des DNF en fonction des sous-types de MA. Les illustrations représentent le sous-type épargnant l'hippocampe (à gauche) avec une pathologie corticale plus importante, bien que l'hippocampe soit tout de même atteint à des stades avancés. Le sous-type typique de MA (à droite) montre des atteintes limbiques et corticales classiquement attendues. Graff-Radford et al., 2021.

Dans la PSP, 7 stades de progression de la pathologie tau ont été décrits (Williams et al., 2007). L'axe pallido-nigro-lusien (pallidum, substance noire et noyaux sous-thalamiques) est touchée en premier par la pathologie tau quel que soit le sous-type clinique de PSP. C'est la région la plus vulnérable et la plus sévèrement touchée. La pathologie tau s'étend ensuite classiquement dans les ganglions de la base et dans le noyau pédonculopontin situé au niveau du pont supérieur du tronc cérébral puis, dans les lobes frontaux et temporaux et le cervelet. Quant aux lésions gliales, elles sont précoces dans les oligodendrocytes du pallidum et les astrocytes du striatum. Les astrocytes corticaux sont ensuite touchés avant les neurones et les oligodendrocytes. Cependant, il existe des différences de progression et de localisation de la pathologie tau dans les régions et les types cellulaires selon les sous-types cliniques de PSP (Kovacs et al., 2020; Steele et al., 2014; Williams et al., 2007).

Dans la maladie de Pick, une seule étude réalisée à partir de 21 cerveaux a décrit quatre stades de progression de la pathologie tau (Irwin et al., 2016), qui sont encore à confirmer par

d'autres études. Elle débute dans les régions fronto-temporales limbiques et paralimbiques et dans le néocortex (stade 1) puis elle s'étend aux structures sous-corticales incluant les ganglions de la base, le locus coeruleus et le noyau du raphé (stade 2). Elle touche ensuite le cortex moteur primaire et les noyaux précérébelleux pontiques (stade 3) et enfin le cortex visuel dans les cas les plus sévères (stade 4). Cette description est valable principalement pour les patients présentant le variant comportemental de la maladie.

5. Vulnérabilité cellulaire

Les différences de progression spatio-temporelle de la pathologie tau ont fait émerger le concept de vulnérabilité cellulaire. En effet, la pathologie progresse le long des connexions anatomiques aussi bien en direction antérograde que rétrograde tout en épargnant certaines régions ou types cellulaires également connectés aux régions touchées (Cornblath et al., 2021). Dans la MA, les neurones les plus vulnérables sont les larges neurones pyramidaux de la couche II du cortex entorhinal, du subiculum et de la CA1 de l'hippocampe, les neurones cholinergiques du prosencéphale basal et les neurones noradrénergiques du locus coeruleus. À l'inverse, les neurones inhibiteurs exprimant des protéines qui fixent le calcium sont moins vulnérables (Fu et al., 2018). De plus, certaines tauopathies sont très focales comme la maladie de Pick alors que d'autres sont plus globales comme la MA. Il est intéressant de noter que dans la MA, les neurones contenant des DNF sont fortement connectés. Pourtant les cellules granulaires du gyrus denté, qui reçoivent la majeure partie des projections du cortex entorhinal, sont relativement résistantes à la pathologie (Hyman et al., 1984). À l'inverse, les corps de Pick sont présents plus facilement dans ces cellules (Probst et al., 1996). Ces différences pourraient s'expliquer par une différence de vulnérabilité des populations cellulaires face aux pathologies tau (Rebeck & Hyman, 1993).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette vulnérabilité comme la génétique, l'âge, l'homéostasie protéique, calcique et mitochondriale, les systèmes de dégradation, la demande énergétique, les différents stress ou encore les altérations de certaines voies métaboliques (Fu et al., 2018; Mrdjen et al., 2019). Il est donc nécessaire de mieux caractériser les sous-types cellulaires aux niveaux moléculaire et génétique pour comprendre la vulnérabilité cellulaire. Dans la MA, les lésions s'accumulent majoritairement dans les neurones excitateurs en comparaison avec les neurones inhibiteurs (Fu et al., 2019). L'expression des gènes, mais pas de MAPT, corrèle avec cette vulnérabilité (Cornblath et al., 2021). Par exemple, lorsque que l'expression du gène facilitateur de l'autophagie et régulateur de l'homéostasie de tau, BAG3, est réduite dans les neurones, l'accumulation de tau est exacerbée (Fu et al., 2019). De plus, bien que l'expression globale de tau ne soit pas corrélée à la vulnérabilité (Cornblath et al., 2021), l'expression des différentes isoformes varie selon les régions (Mrdjen et al., 2019). Le rapport 3R/4R diminue du cortex entorhinal à la CA4 de l'hippocampe, en passant par la CA1. Cela imite, dans une certaine mesure, l'organisation spatiale de la vulnérabilité cellulaire associée à ces régions (Mrdjen et al., 2019). La vulnérabilité pourrait donc s'expliquer par les propriétés cellulaires intrinsèques, mais pas seulement. Elle pourrait également s'expliquer par les propriétés des espèces de tau qui se propagent (ligand/récepteur, voies de propagation, composition en isoformes, etc.). Ces concepts sont encore très peu explorés aujourd'hui. Il est donc essentiel de comprendre par quels mécanismes la pathologie progresse dans le cerveau pour tenter de mieux comprendre pourquoi certaines régions ou cellules sont plus vulnérables que d'autres face à la pathologie.

III- Propagation de la pathologie tau

La progression de la pathologie dans le cerveau a d'abord été perçue comme passive, liée à la mort des neurones malades (Arai et al., 1995; Hall & Saman, 2012; Tato et al., 1995). Elle a également été considérée comme liée à des événements indépendants ou bien liée à des concentrations de tau trop importantes à certains endroits qui conduisaient à leur agrégation. Seulement, il est maintenant évident que la pathologie tau progresse de façon active, bien avant la mort des neurones (Gibbons et al., 2019; Medina & Avila, 2014; Morsch et al., 1999). Aujourd'hui, l'hypothèse de propagation de type prion de la pathologie tau est très influente. La protéine tau va acquérir une conformation anormale capable de recruter les formes normalement conformées et de les convertir selon ce modèle de conformation anormale. L'oligomérisation progressive de ces formes anormales va conduire à la formation d'agrégats intracellulaires. Les formes mal conformées passeraient ensuite de cellule en cellule propageant ainsi la pathologie. Cette hypothèse est née des découvertes faites dans les maladies à prions.

1. Les maladies à prions

Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives rares dont la première description chez l'animal remonte au XVIII^{ème} siècle (P. Brown & Bradley, 1998). La tremblante du mouton, ou scrapie, est une encéphalopathie spongiforme transmissible, dont la période d'incubation est très longue (plusieurs années). Une fois que les premiers symptômes sont apparus la maladie évolue par contre très rapidement jusqu'au décès. Les moutons ne présentaient aucun signe d'inflammation ou de contamination microbienne ce qui laissait penser que la cause était autre qu'un virus ou une bactérie. Au cours des décennies suivantes, plusieurs autres maladies à prions ont été décrites chez les animaux mais aussi chez l'Homme comme la maladie de Creutzfeld-Jakob, la maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, les insomnies fatales familiales et le kuru (Walker & Jucker, 2015). Elles se caractérisent par une démence à laquelle s'ajoutent des troubles moteurs et visuels et des crises d'épilepsies. 100 à 150 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France, ce qui en fait des maladies rares (www.inserm.fr).

Face aux similitudes entre toutes ces maladies, Stanley Prusiner a cherché à identifier l'agent infectieux responsable de la tremblante du mouton espérant ainsi mieux comprendre les autres maladies. Il a émis l'hypothèse qu'une protéine pouvait être l'agent infectieux et l'unique responsable de cette pathologie (Prusiner, 1982). C'est la première fois qu'un agent infectieux sans acide nucléique était décrit, contrairement aux agents déjà connus que sont les virus, les bactéries ou encore les parasites. Prusiner nomma cet agent la protéine prion (pour *proteinaceous infectious particles*). Ses travaux ont été très controversés du fait de leur originalité, néanmoins son hypothèse s'est rapidement confirmée (Liberski, 2014) et il reçut le prix Nobel de médecine en 1997.

La protéine prion ou PrPc (pour cellulaire) est exprimée de façon physiologique chez de nombreuses espèces. C'est une glycoprotéine présente à la membrane plasmique des cellules. Ses fonctions sont encore mal comprises mais elle serait impliquée dans la survie cellulaire et la protection contre le stress oxydatif ainsi que dans l'adhérence cellulaire et le déclenchement de voies de signalisation intracellulaire (Cazaubon et al., 2007). En conditions pathologiques, la protéine prion PrPc acquiert une conformation tridimensionnelle anormale. Elle se replie sur

elle-même devenant peu soluble et résistante à la dégradation. On parle alors de protéine prion « scrapie » ou PrP^{Sc}. La PrP^{Sc} sert alors de modèle pour la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc}. Cette conversion conduit à la formation d'un noyau oligomérique de protéines PrP^{Sc} pro-nucléantes, c'est-à-dire capable de recruter des monomères PrP^c pour former à terme des structures fibrillaires. Ce mécanisme d'ensemencement est communément appelé « seeding » (Jucker & Walker, 2013). Il permet d'amplifier de manière exponentielle le nombre d'espèces protéiques agrégées dans la cellule. La progression de la pathologie est alors liée à la propagation intercellulaire d'espèces PrP^{Sc} dans différentes régions du cerveau anatomiquement connectées. Cette propagation pourrait notamment avoir lieu via la sécrétion de vésicules extracellulaires (VEs) contenant le PrP^{Sc} (Fevrier et al., 2004; Vella et al., 2007).

1.1. Transmissibilité intra-espèce

La tremblante du mouton est connue depuis longtemps comme étant transmissible entre les individus de la même espèce. Chez l'Homme, la transmission interindividuelle des maladies à prions a été rapportée dans les années 1950 dans la tribu des Fores en Papouasie Nouvelle-Guinée (Hadlow, 1959; Gajdusek, 1977). Le Kuru, qui signifie « trembler de peur » en foré, est une encéphalopathie spongiforme observée chez les membres de cette tribu qui pratiquaient des rites funéraires cannibales. Le Kuru touchait principalement les femmes et les enfants qui consommaient le cerveau alors que les hommes consommaient plutôt les muscles.

La similitude des lésions présentes dans le cerveau des patients atteints de Kuru et celles présentes dans le cerveau des moutons atteints de tremblante ont conduit à démontrer que le Kuru pouvait être transmis entre individus de la même espèce par inoculation. Ce concept d'encéphalopathie spongiforme transmissible a ensuite été démontré pour la maladie de Creutzfeld-Jakob, la maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker et les insomnies fatales familiales.

Plus de 450 cas de maladie de Creutzfeld-Jakob sont survenus dans le monde : 1) après l'administration d'hormones de croissance humaine dérivées de l'hypophyse de personnes décédées, après une greffe de dure-mère ou de cornée de donneurs atteints, 2) après une neurochirurgie ou un enregistrement d'électroencéphalographie avec des dispositifs médicaux mal stérilisés, ou encore 3) après transfusion sanguine (Stopschinski & Diamond, 2017). La maladie pouvant se déclarer plusieurs dizaines d'années après la transformation du PrP^c en PrP^{Sc}, il n'était pas possible de prévoir ces contaminations. Depuis, les hormones de croissance sont produites par génie génétique, les greffes de dure-mère sont interdites et les procédures de décontamination et de stérilisation ont évolué et permettent maintenant d'éliminer le prion PrP^{Sc}, beaucoup plus résistant que les virus ou les bactéries pour lesquels ces procédures suffisaient.

1.2. Transmissibilité inter-espèces

Les différences dans la séquence d'acides aminés du prion entre les espèces ont fait croire qu'une transmission inter-espèces était impossible (88% d'homologies entre la séquence du prion humain et celle du prion bovin par exemple). Cependant, la crise de vache folle dans les années 1990 a remis en question cette idée. La maladie de la « vache folle », ou encéphalopathie spongiforme bovine, semble être liée à l'inoculation de prions ovins présents dans l'alimentation des bovins. En effet, les farines animales servant à nourrir les bovins contenaient des prions

PrP^{Sc} de moutons atteints de tremblante capables de transmettre leur conformation au PrP^C bovin. Les PrP^{Sc} bovins ont alors été transmis à l'Homme via la consommation de viande contaminée provoquant des cas de variant de la maladie de Creutzfeld-Jakob chez des patients jeunes (figure 14). Dans le monde, environ 230 personnes ont été contaminées par le PrP^{Sc} bovin dont 27 en France. Ainsi, le PrP^C humain peut être transformé par le PrP^{Sc} bovin (Hagiwara et al., 2013). Cependant, il ne semble pas pouvoir être transformé directement par le PrP^{Sc} ovin donc ce phénomène n'est pas général et pourrait dépendre de la conformation de la protéine prion selon les espèces (Concepcion et al., 2005).

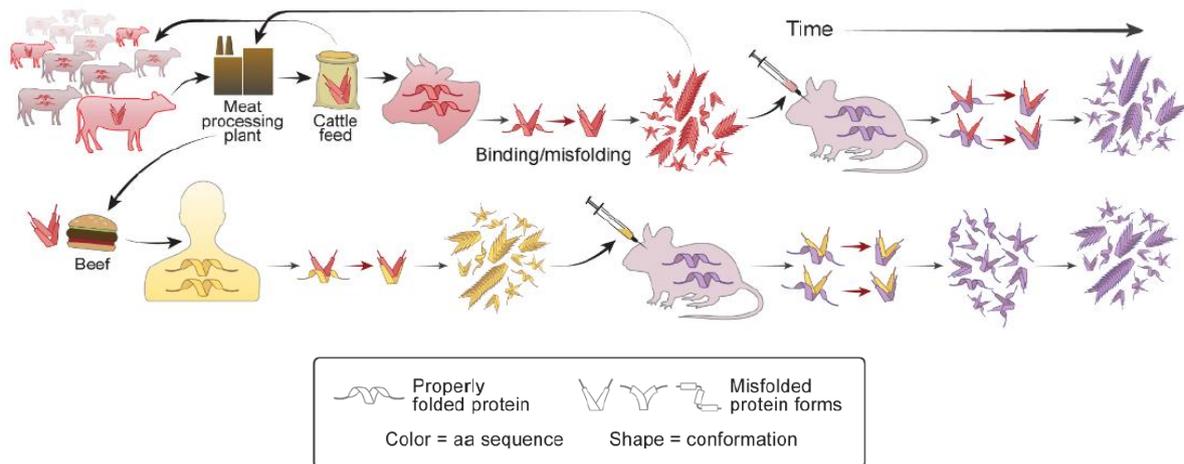


Figure 14 : Transmission inter-espèces d'un PrP^{Sc} bovin mal replié. L'ingestion chez le bovin et chez l'Homme de PrP^{Sc} bovine entraîne le repliement et l'agrégation des protéines prions endogènes PrP^C. L'inoculation de ces espèces chez la souris déclenche également une pathologie bien que la structure primaire du prion bovin, humain et murin soit différente. Carlson & Prusiner, 2021.

1.3. Existence de souches

La diversité des maladies à prions peut s'expliquer par l'existence de différentes souches de prions. Une souche est une conformation tridimensionnelle particulière et stable d'une même protéine capable de transmettre sa conformation aux protéines normales (Prusiner, 2013). Les différentes souches ou conformères vont avoir des propriétés biochimiques distinctes entraînant des différences dans le temps d'incubation, l'évolution neuropathologique et clinique et l'agressivité de chaque maladie à laquelle elles sont associées (Telling et al., 1996).

1.4. « Propagation » du concept prion à d'autres protéines

Les maladies à prions ont permis de découvrir que d'autres protéines, acquérant une conformation pathologique transmissible, sont également responsables de diverses maladies. Récemment, l'hypothèse selon laquelle d'autres protéines, comme le peptide A β , l' α -synucléine et la protéine tau, pourraient partager les propriétés du prion, a été proposée (Carlson & Prusiner, 2021).

La désignation «prion-like» (ou « de type prion » en français) fait l'objet d'un débat sémantique intense parmi les chercheurs car même si la protéine tau partagent des caractéristiques pathologiques similaires au prion, des différences majeures peuvent également être soulignées (Mudher et al., 2017). Néanmoins, quelques études princeps ont conduit à orienter les recherches dans ce sens. Il a notamment été montré *in vitro* que la formation d'un noyau oligomérique de protéines tau conduit à la formation de structures fibrillaires (Friedhoff et al., 1998). De plus, la mise en évidence de différentes conformations de protéine tau capables de transmettre leur conformation aux protéines sauvages suggère l'existence de souches pour la protéine tau (Frost, Jacks, et al., 2009). Enfin, la transmission et la propagation de la pathologie tau *in vivo* chez la souris (Clavaguera et al., 2009, 2013; Sanders et al., 2014) supporte une nouvelle fois l'existence de similitudes entre la protéine tau et le prion. À l'heure actuelle, beaucoup d'études vont dans ce sens et le mécanisme conduisant à l'agrégation de la protéine tau à partir d'un noyau pro-nucléant anormalement conformé est maintenant largement accepté.

2. Propagation de type prion de la pathologie tau

2.1. Transmission de la pathologie tau

Plusieurs évidences vont dans le sens d'une transmission de la pathologie tau. Une étude princeps a notamment montré l'induction d'une agrégation de protéines tau hyperphosphorylées après l'injection d'agrégats extraits de cerveaux de souris transgéniques exprimant une tau humaine mutée (P301S) dans le cerveau de souris transgéniques exprimant la protéine tau humaine sauvage (modèle ALZ17) (Clavaguera et al., 2009). Il est intéressant de noter que lorsque l'extrait est immunodéplété en protéines tau, aucune pathologie n'est détectée démontrant bien qu'elle en est la responsable (Clavaguera et al., 2009). Le même groupe a également injecté des lysats de cerveaux humains atteints de différentes tauopathies dans le modèle ALZ17 et a observé l'apparition de lésions ayant la même morphologie que celles observées chez l'Homme (Clavaguera et al., 2013). Ensuite, de nombreuses études ont confirmé la transmission de la pathologie tau suite à des injections de lysats cérébraux ou de fibres recombinantes chez des animaux transgéniques (Ahmed et al., 2014; Dai et al., 2018; Gibbons et al., 2017; Iba et al., 2013, 2015; Kaufman et al., 2016; D. Kim et al., 2015; Peeraer et al., 2015; Sanders et al., 2014; Jackson et al., 2016; Smolek et al., 2019; Stancu et al., 2015). Plusieurs de ces études montrent la présence de la protéine tau murine au sein des lésions suggérant que les agrégats sont capables de recruter des protéines d'une autre espèce en les convertissant en une forme pathologique (Clavaguera et al., 2009; de Calignon et al., 2012; Iba et al., 2013; Narasimhan et al., 2017). Ceci est également étayé par l'observation que la pathologie tau est transmissible aux souris sauvages qui ne développent normalement jamais de pathologie tau (Clavaguera et al., 2009; Narasimhan et al., 2017).

En revanche, aucune évidence de transmission inter-individu n'a été rapportée pour les tauopathies, comme c'est le cas pour le Kuru ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob. De grandes études épidémiologiques (Beekes et al., 2014; Irwin et al., 2013) n'ont révélé aucun risque accru de MA après une transfusion sanguine ou après l'administration d'hormones de croissance comme pour le prion (Duyckaerts et al., 2018). Ce contraste avec les encéphalopathies spongiformes transmissibles pourrait être dû à la résistance particulière de la PrP^{Sc} à la dégradation comparativement aux autres protéines amyloïdes comme tau.

2.2. Existence de souches ?

L'hétérogénéité entre les tauopathies aussi bien au niveau clinique qu'au niveau de la morphologie des inclusions de tau, de leur distribution et de leurs caractéristiques biochimiques, ont conduit à se demander si, comme pour le prion, il n'existait pas différentes souches ou conformères de tau.

Tout d'abord, les protéines tau mutées semblent avoir des morphologies de fibres et des caractéristiques biochimiques différentes des protéines sauvages ce qui influence leur capacité de nucléation (Aoyagi et al., 2007; Falcon et al., 2015; Frost, Ollesch, et al., 2009). La conformation des fibres de protéine tau mutée peut être transmise et conservée par la protéine tau sauvage au cours du processus de nucléation et d'agrégation (Falcon et al., 2015; Frost, Ollesch, et al., 2009). De plus, les propriétés des fibres vont varier selon leur constitution en isoformes de tau (Adams et al., 2010; Falcon, Zhang, Murzin, et al., 2018; Furukawa et al., 2011; Levarska et al., 2013; Nonaka et al., 2010). Ces propriétés pourraient expliquer les différentes morphologies des lésions observées dans les tauopathies et les différences d'évolution spatio-temporelle de la pathologie tau.

La comparaison des fibres des différentes tauopathies sporadiques et de leur capacité à recruter la protéine tau a conduit à l'identification de souches potentielles (Clavaguera et al., 2013; Kaufman et al., 2016; Sanders et al., 2014). L'équipe de Marc Diamond a mis au point un test cellulaire modélisant le processus de nucléation et d'ensemencement *in vitro* (Furman et al., 2015; Holmes et al., 2014). Après transfection de lysat cérébral de diverses tauopathies dans ce modèle, la morphologie des agrégats intracellulaires diffère selon la tauopathie. Une fois injecté dans un modèle de tauopathie, différentes lésions et voies de progression sont observées (Kaufman et al., 2016; Sanders et al., 2014), en accord avec le constat fait précédemment (Clavaguera et al., 2013). Il est important de noter que l'injection de fibres de protéine tau issues de patients MA et celles issues de protéine recombinante n'entraînent pas la même pathologie *in vivo* (J. L. Guo et al., 2016).

Bien que ces résultats soient cohérents avec l'existence de conformères distincts, la définition de ces conformères doit être structurale. En 2006, l'ultrastructure des fibres de protéine tau a été mise en évidence par microscopie électronique. Selon qu'il s'agisse de fibres issues de MA, de PSP, de Pick ou encore de DCB, la taille et la morphologie des fibres étaient différentes (Arima, 2006). De plus, l'étude de la résistance à la trypsine des agrégats dans différentes tauopathies (MA, PSP, Pick, DCB, FTPD-17) a révélé que les cœurs des filaments étaient composés de différentes régions situées entre les résidus 243 et 406, indiquant que les conformations des cœurs sont spécifiques à chaque maladie (Taniguchi-Watanabe et al., 2016). Des études récentes en microscopie électronique cryogénique ont clairement identifié la structure des filaments dans la MA sporadique et familiale (Falcon, Zhang, Schweighauser, et al., 2018; Fitzpatrick et al., 2017), la maladie de Pick (Falcon, Zhang, Murzin, et al., 2018), l'encéphalopathie traumatique chronique (Falcon et al., 2019), la DCB (W. Zhang et al., 2020), ou encore la PSP (Shi et al., 2021) (**figure 15**). Les mêmes structures sont observées pour la MA, les démences familiales Danoise et Britannique et la tauopathie primaire liée à l'âge (Shi et al., 2021). Elles le sont aussi chez les individus atteints de la même tauopathie. Il est intéressant de noter que les filaments de tau produits à partir de protéines recombinantes, et utilisés dans beaucoup d'études pour mimer la pathologie, ont une structure différente de ceux retrouvés dans les tauopathies (W. Zhang et al., 2019).

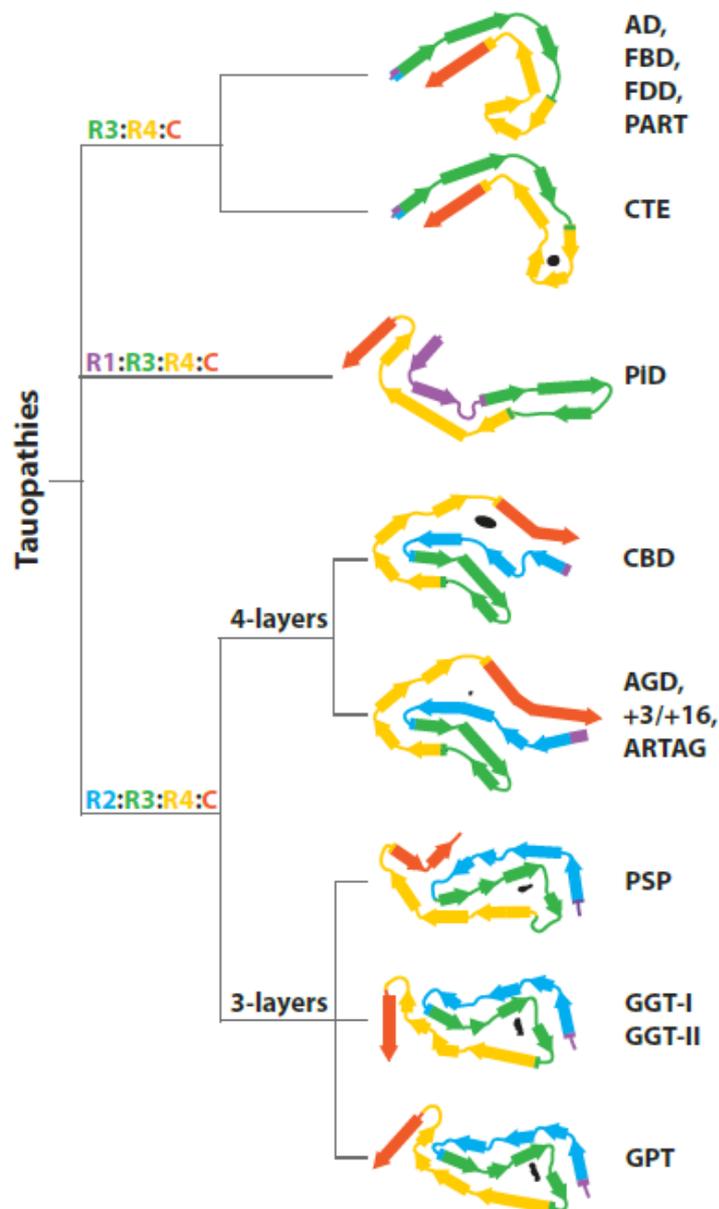


Figure 15 : Classification des tauopathies selon la structure des cœurs des filaments de tau. Représentation schématique du repliement des domaines de répétitions (R1 : violet, R2 : bleu, R3 : vert, R4 : jaune) et de la partie C-terminale (orange). AD = Maladie d'Alzheimer, FBD = Démence familiale Britannique, FDD = Démence familiale Danoise, PART = Tauopathie primaire liée à l'âge, CTE = Encéphalopathie traumatique chronique, PiD = Maladie de Pick, CBD = Dégénérescence cortico-basale, AGD = Démence à grains argyrophiles, +3/+16 = Cas avec mutations dans l'intron 10, ARTAG = Astroglieopathie tau liée à l'âge, GGT = Tauopathie gliale globulaire, GPT = Contraction de PSP et GGT du fait de la ressemblance de ce repliement avec les deux autres. Shi et al., 2021.

En conclusion, les évidences structurelles montrent plusieurs conformations de protéine tau selon les tauopathies en lien avec la morphologie des lésions et leur composition en isoformes de tau.

2.3. Taille moléculaire des espèces de tau responsables de la propagation

Au cours du processus d'agrégation, plusieurs espèces de tau de tailles moléculaires différentes sont générées (figure 16). Toutefois, la taille moléculaire minimale nécessaire et suffisante pour former un noyau servant de modèle pour la nucléation est encore une source de débat, tout comme la taille des espèces qui se propagent de cellules en cellules.

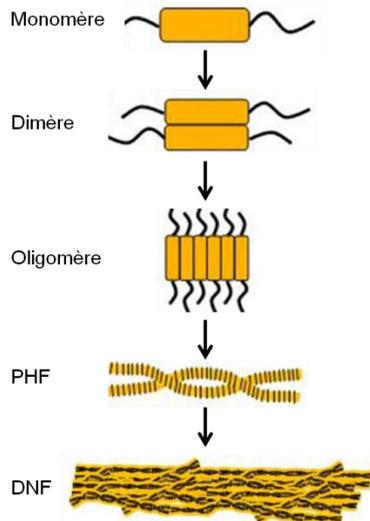


Figure 16 : Étapes de transition entre la protéine tau monomère soluble et les dégénérescences neurofibrillaires. Toutes ces formes ont été décrites comme potentiellement capables d'entraîner le recrutement et la nucléation de tau. Il reste donc à déterminer laquelle de ces formes est responsable de la propagation de la pathologie. Modifiée d'après Cowan & Mudher, 2013.

Les DNF ont longtemps été considérées comme toxiques pour les neurones bien que des études contestent cette opinion (Cowan & Mudher, 2013; Spires-Jones et al., 2011). Dans le cerveau humain, les neurones avec des DNF peuvent survivre pendant plusieurs années (Morsch et al., 1999). Les agrégats filamenteux pourraient occuper l'espace mais être des lésions biologiquement inertes qui étouffent lentement et tuent à terme les neurones. En captant les protéines tau solubles, ils pourraient finalement contribuer à limiter leur propagation vers d'autres cellules. Toutefois, plusieurs études ont montré, *in cellulo*, qu'après incubation avec des agrégats, ceux-ci étaient internalisés et pouvaient favoriser l'agrégation de protéines tau surexprimées dans des lignées cellulaires (Frost, Jacks, et al., 2009; J. L. Guo & Lee, 2011; Holmes et al., 2014; Nonaka et al., 2010; Santa-Maria et al., 2012; Takahashi et al., 2015; Woerman et al., 2016), des neurones primaires et des iPSCs humaines surexprimant tau (Nobuhara et al., 2017; Reilly et al., 2017; Takeda et al., 2015). *In vivo*, l'injection intracérébrale de fibres de protéines tau purifiées à partir de cerveaux de patients MA entraîne la formation et la propagation d'inclusions chez des souris sauvages (J. L. Guo et al., 2016). Il est important de préciser que les agrégats de tau formés dans le cerveau de souris sont plus enclins à recruter la protéine tau soluble endogène que les agrégats formés *in vitro* à partir de protéines recombinantes (Falcon et al., 2015). Du fait de leur taille, il est toutefois peu probable que les agrégats soient sécrétés de façon active par les neurones participant ainsi directement à la propagation. *In vitro*, une étude a montré que des petits agrégats de protéines tau de bas poids moléculaires (entre 100 et 250 kDa), mais pas des grandes fibres, étaient endocytés au niveau somato-dendritique et axonal dans les neurones puis transportés le long des axones de façon antérograde et rétrograde (J. W. Wu et al., 2013).

De plus en plus d'études démontrent que les oligomères solubles de tau sont plus sujets à induire la nucléation de tau que les agrégats, et qu'ils suffisent à endommager les neurones et la fonction synaptique (D. Kim et al., 2015; Lasagna-Reeves et al., 2011; Lasagna-Reeves, Castillo-

Carranza, Sengupta, Guerrero-Munoz, et al., 2012; Lasagna-Reeves, Castillo-Carranza, Sengupta, Sarmiento, et al., 2012; Jackson et al., 2016; Takeda et al., 2015). Des oligomères de protéines tau ont notamment été mis en évidence dans le cerveau de patients MA et FTDP-17 (Berger et al., 2007; Lasagna-Reeves, Castillo-Carranza, Sengupta, Sarmiento, et al., 2012; Maeda et al., 2006). L'agrégation de la protéine tau ainsi que la propagation de la pathologie peut se produire après l'injection d'oligomères d'origine humaine (Lasagna-Reeves, Castillo-Carranza, Sengupta, Guerrero-Munoz, et al., 2012). De plus, la concentration d'oligomères corrèle avec les pertes mnésiques dans plusieurs modèles murins de tauopathies (Berger et al., 2007). Les concentrations d'espèces de hauts poids moléculaires, comprenant les oligomères, dans le cerveaux de patients MA corrèlent également avec l'agressivité de la maladie (Dujardin et al., 2020). Dans des neurones dérivés d'iPSC traités avec des oligomères de tau, une augmentation de la phosphorylation et de l'agrégation de tau associée à une perte de l'homéostasie cellulaire et une perte synaptique sont observées. Ces effets ne sont cependant pas observés après application de monomères (Usenovic et al., 2015). De la même manière, des espèces de hauts poids moléculaires phosphorylées et solubles issues de patients MA et de souris transgéniques semblent être à l'origine de la propagation de la protéine tau *in vitro* dans des neurones primaires en microfluidique (Takeda et al., 2015). Toutefois, les notions d'espèces de hauts poids moléculaires et d'oligomère sont floues. « Oligo » signifie « peu abondant » en grec, ce qui est très subjectif et très dépendant des études. Selon celles citées précédemment, les oligomères peuvent aller de 80 kDa à plus de 700 kDa.

En 2015, une étude rapporte que le trimère de tau est l'unité minimale avec laquelle un mécanisme de nucléation peut être observé (Mirbaha et al., 2015). En 2018, les mêmes auteurs montrent que le monomère de tau, issus de cerveaux de patients MA, peut porter une conformation stable capable d'induire la nucléation (Mirbaha et al., 2018). Cela passe par une exposition des deux hexapeptides, ce qui va à l'encontre de résultats précédents montrant que le monomère de tau en solution n'a qu'un repliement transitoire avec les domaines de répétition masqués par les extrémités N- et C-terminales (Mukrasch et al., 2009). La question se pose alors de savoir ce qui stabilise le monomère de tau dans une conformation stable dans certaines conditions mais pas dans d'autres. Plus récemment encore, une étude montre qu'un peptide de tau formant le cœur des filaments est capable de s'agréger spontanément et de recruter la tau entière sauvage pour former des filaments (Carlomagno et al., 2021).

Toutes les tailles moléculaires de tau semblent donc capables d'induire sa nucléation. Il est maintenant important de comprendre lesquelles sont impliquées dans la propagation intercellulaire de la pathologie chez l'Homme.

2.4. Propagation intercellulaire de la protéine tau

2.4.1. Liquide interstitiel : support de la propagation

Pour qu'il y ait une propagation, tau doit passer d'une cellule à l'autre. Cela sous-entend un passage de tau par le milieu extracellulaire qui sépare les cellules. Le parenchyme cérébral est composé des cellules neuronales et gliales, du système vasculaire et du système interstitiel (**figure 17**). Ce dernier représente 15 à 20% du volume cérébral et est composé de liquide interstitiel (ISF) et de la matrice extracellulaire (MEC) (Lei et al., 2017). La MEC est produite et sécrétée par les cellules. Elle contient du collagène, de l'élastine, des glycosaminoglycane, des protéoglycane et des glycoprotéines comme la laminine et la fibronectine (Shetty & Zanirati, 2020). L'ISF représente le liquide dans lequel baignent les cellules. Il leur fournit un support

pour l'approvisionnement en nutriments, l'élimination des déchets et la communication intercellulaire. Il est composé d'eau, d'ions, de molécules gazeuses et organiques telles que des protéines, des peptides, des enzymes, des neurotransmetteurs mais aussi des VEs (Lei et al., 2017). L'échange de substances entre le système interstitiel et les cellules se produit en continu (Ding et al., 2016).

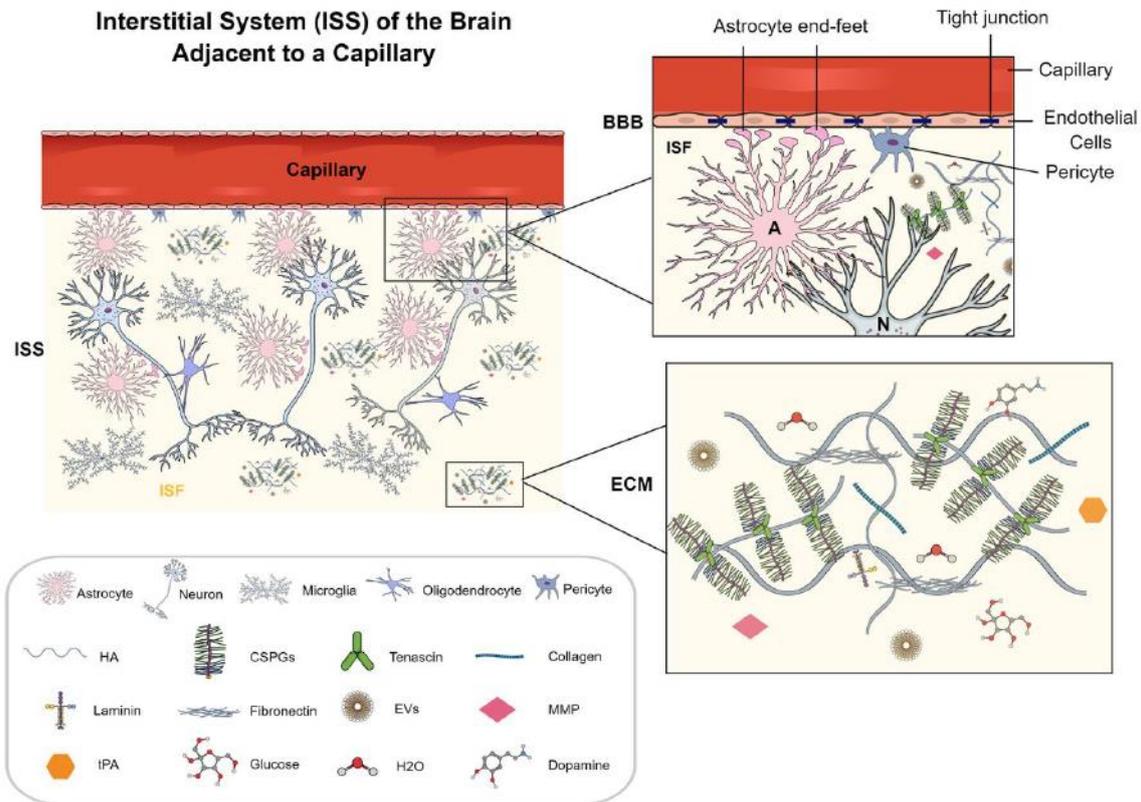


Figure 17 : Système interstitiel cérébral entourant les cellules et comprenant le liquide interstitiel, la matrice extracellulaire et le système vasculaire. La première vue agrandie représente les cellules endothéliales, les pieds astrocytaires et les péricytes formant la barrière hémato-encéphalique. Elle est à l'interface entre le système interstitiel et le système vasculaire. La seconde vue agrandie fournit un aperçu des composants de la matrice extracellulaire. Tout ce qui est sécrété par les cellules cérébrales se retrouve directement dans l'ISF. Shetty & Zanirati, 2020.

2.4.2. Propagation trans-synaptique ou extra-synaptique ?

Comme abordée précédemment, une progression stéréotypée des lésions selon des voies neuro-anatomiques connectées a été décrite dans plusieurs tauopathies. Par exemple, dans la MA, la couche II du cortex entorhinal est connectée uniquement aux neurones de l'hippocampe qui sont ensuite touchés par la pathologie (Braak & Braak, 1991). Il a donc été proposé que les espèces pro-nucléantes de tau se propagent de neurone en neurone au niveau synaptique.

Plusieurs études montrent *in vivo* qu'après l'injection d'espèces pro-nucléantes de tau, la pathologie se propage au-delà du site d'injection à des régions synaptiquement connectées (Ahmed et al., 2014; Calafate et al., 2015; Clavaguera et al., 2009, 2013; J. L. Guo et al., 2016; Iba

et al., 2013; Kaufman et al., 2017; Liu et al., 2012; Sanders et al., 2014). L'utilisation de vecteurs viraux permettant l'expression d'espèces de tau spécifique limitée à une région ou un type cellulaire a également permis de montrer un transfert de tau sur de longues distances en suivant les connexions synaptiques (Dujardin, Lécolle, et al., 2014; Dujardin et al., 2018; Wegmann et al., 2015, 2017). La propagation de tau sur de longues distances est plus efficace pour l'isoforme 1N4R que pour l'isoforme 1N3R. De même, certaines mutations semblent également altérer la capacité de propagation des isoformes (Caillierez et al., 2013; Dujardin, Lécolle, et al., 2014; Dujardin et al., 2018). L'expression de la protéine tau humaine restreinte au cortex entorhinal dans des souris transgéniques a permis de confirmer une propagation vers des régions connectées comme dans le gyrus denté, les cornes d'Ammon de l'hippocampe et le cortex cingulaire (de Calignon et al., 2012).

Cette propagation trans-synaptique résulterait de la sécrétion de la protéine tau par la terminaison pré-synaptique et de sa captation par le neurone post-synaptique. Grâce à la technique de microfluidique, qui permet de connecter des neurones les uns aux autres en isolant les axones dans des microcanaux, l'implication des synapses dans le transfert interneuronal de la protéine tau a pu être mise en évidence (Calafate et al., 2015; Dujardin, Lécolle, et al., 2014; Takeda et al., 2015; Y. Wang et al., 2017). Des espèces de hauts poids moléculaires de tau sont notamment transportées le long des axones avant d'être transférées à d'autres neurones (Takeda et al., 2015). Chez des patients atteints de MA, la nucléation de la protéine tau au niveau des synapses semble précéder l'apparition des inclusions (DeVos et al., 2017). Cependant, le transfert de la protéine tau est un phénomène physiologique qui a lieu en absence de tout phénomène de nucléation (Croft et al., 2017; Pooler et al., 2013).

De manière intéressante, dans les modèles de propagation *in vivo*, il arrive d'observer une propagation de tau dans les régions adjacentes mais non connectées au site d'injection (Clavaguera et al., 2009; Iba et al., 2013; Stancu et al., 2015). Bien que cela pourrait s'expliquer par une diffusion de la protéine tau autour du site d'injection, nous ne pouvons pas exclure qu'elle puisse se propager en dehors des synapses. Dans des modèles cellulaires, le transfert de milieu conditionné contenant de la protéine tau est suffisant pour qu'elle soit transférée dans les cellules suggérant que les contacts synaptiques ne sont pas forcément nécessaires (Calafate et al., 2015; Kfoury et al., 2012; Yanamandra et al., 2013). D'autant plus que l'internalisation ne se fait pas uniquement au niveau des terminaisons synaptiques mais aussi au niveau somatique (Calafate et al., 2015; Frost, Jacks, et al., 2009; Kfoury et al., 2012; Nobuhara et al., 2017; Takeda et al., 2015; J. W. Wu et al., 2013; Yanamandra et al., 2013). Plusieurs mécanismes pourraient donc permettre l'internalisation de la protéine tau dans la cellule receveuse. D'autres observations vont également dans le sens d'une propagation extra-synaptique de tau (Narasimhan et al., 2017). En effet, dans certaines tauopathies la présence d'inclusions dans les astrocytes et les oligodendrocytes ne peut pas s'expliquer par une propagation trans-synaptique. De plus, il a été montré que la protéine tau pouvait se propager via les VEs dont la taille est comprise entre 30 et 500 nm environ (Guix et al., 2018; Polanco et al., 2016, 2018; Ruan et al., 2021; Y. Wang et al., 2017), or la taille des synapses est de l'ordre de 20 à 40 nm ce qui est incompatible notamment avec les grosses VEs.

Deux voies permettraient donc à la protéine tau de se propager : la voie trans-synaptique et la voie extra-synaptique. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre avec quelles temporalité et efficacité ces voies interviennent.

3. Mécanismes de propagation intercellulaire

Plusieurs mécanismes ont été décrits comme permettant le transfert intercellulaire de tau (figure 18). La protéine tau peut être transférée via des nanotubes qui se forment entre deux cellules. Elle peut également être sécrétée sous forme libre dans le milieu extracellulaire ou bien contenue dans des VEs (microparticules et exosomes sur le schéma). La majorité de la protéine tau sécrétée est sous forme libre ($\approx 90\%$) et non sous forme vésiculaire ($\approx 10\%$) (Dujardin, Bégard, et al., 2014; Y. Wang et al., 2017). Ces mécanismes de communication intercellulaire existent physiologiquement, il est donc important de comprendre lesquels sont les plus pertinents dans la propagation de la pathologie tau. Les différents mécanismes identifiés à ce jour seront détaillés dans les paragraphes suivants.

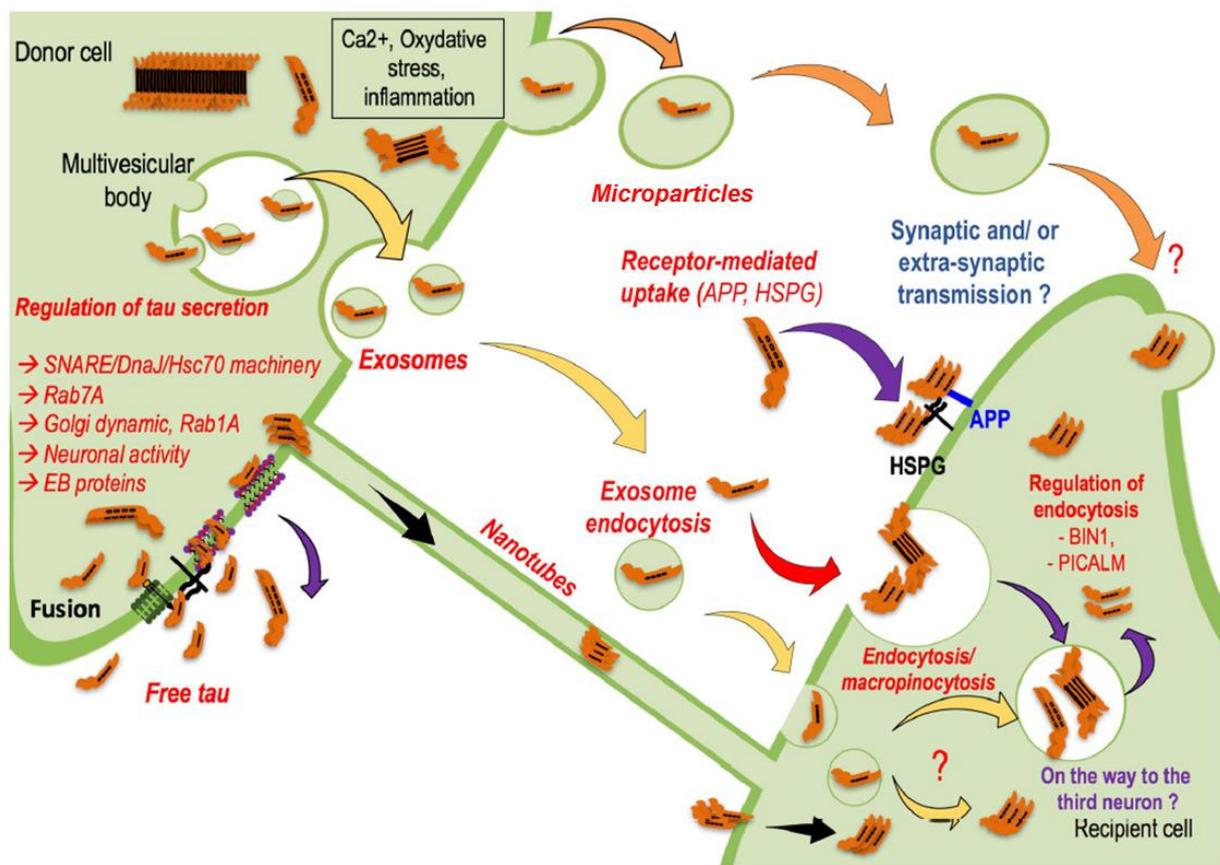


Figure 18 : Mécanismes de transfert intercellulaire de la protéine tau. La protéine tau est majoritairement sécrétée sous forme libre dans le milieu extracellulaire (flèche violette). Plusieurs mécanismes non conventionnels permettent sa sécrétion et des récepteurs tels que les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) ou encore l'APP permettent son internalisation dans la cellule receveuse. La protéine tau peut également être sécrétée et transportée dans des vésicules extracellulaires de deux types : les exosomes (flèche jaune) et les micropaticules (flèche orange). Enfin, elle peut être transportée dans des nanotubes qui forment un pont entre deux cellules. L'implication de ces différents mécanismes physiologiques dans la propagation d'espèces pathologiques de la protéine tau reste encore à définir. Modifié d'après Colin et al., 2020.

3.1. Les nanotubes

Deux groupes, dont le nôtre, ont démontré que le transfert intercellulaire de tau pouvait se faire via des nanotubes (Abounit et al., 2016; Tardivel et al., 2016). Ce sont des extensions cytoplasmiques transitoires composées d'actine qui sont étirées entre les cellules sous la forme de canaux nanotubulaires (50–200 nm) formant des ponts qui relient les cellules distantes. Dans ce cas de figure, tau reste dans l'espace intracellulaire.

3.2. La sécrétion sous forme libre

La présence de protéine tau extracellulaire dans le cerveau a été mise en évidence grâce à son accumulation dans le LCS des patients MA (Hampel et al., 2010; Vandermeeren et al., 1993). Cette localisation extracellulaire a ensuite été mise en évidence par microdialyse *in vivo* chez la souris P301S avant l'apparition de la pathologie tau, suggérant une sécrétion physiologique de tau (K. Yamada et al., 2011). Cela a ensuite été confirmé dans des lignées cellulaires et des neurones primaires surexprimant tau (Chai et al., 2012) ainsi que dans des neurones dérivés d'iPSC (Bright et al., 2015; Guix et al., 2018) et dans l'ISF et le LCS humains (Jr et al., 2013; Magnoni et al., 2012). Sa présence dans l'ISF a permis d'émettre l'hypothèse qu'elle pourrait jouer un rôle dans la propagation. Des études ont montré que la propagation de la pathologie tau pourrait impliquer des espèces allant des monomères aux filaments insolubles (Kfoury et al., 2012; Lasagna-Reeves, Castillo-Carranza, Sengupta, Guerrero-Munoz, et al., 2012; Takeda et al., 2015, 2016). Il est donc essentiel de comprendre quelles espèces de tau sont sécrétées de façon physiologique et en conditions pathologiques, et plus précisément celles impliquées dans la propagation de la pathologie. Tau peut être sécrétée sous forme entière mais dans la majorité des études elle est retrouvée tronquée en C-terminale, déphosphorylée et soluble ce qui va dans le sens d'une sécrétion physiologique (Bright et al., 2015; Chai et al., 2012; Dujardin, Bégard, et al., 2014; Fontaine et al., 2016; Guix et al., 2018; Kanmert et al., 2015; Karch et al., 2012; Katsinelos et al., 2018; W. Kim et al., 2010; Mohamed et al., 2015; Nicholls et al., 2017; Plouffe et al., 2012; Polydoro et al., 2014; Pooler et al., 2013; Saman et al., 2012; Sokolow et al., 2015; Tang et al., 2015; K. Yamada et al., 2014).

3.2.1. Mécanismes de sécrétion

La grande majorité des protéines sécrétées de façon conventionnelle possède un peptide signal qui les dirigent vers la voie de sécrétion impliquant le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi qui les adressent vers la membrane plasmique (M. C. S. Lee et al., 2004). Cependant, on sait maintenant qu'il existe des voies de sécrétion non conventionnelles pour certaines protéines dont la protéine tau qui ne possède pas de peptide signal (Nickel & Rabouille, 2009). Elle peut notamment être transloquée à travers la membrane plasmique grâce à des protéines chaperones (Fontaine et al., 2016) ou être sécrétée de façon active grâce à des Rab GTPase (Mohamed et al., 2017; L. Rodriguez et al., 2017). La translocation à travers la membrane plasmique se ferait grâce à son interaction avec PIP₂, un phospholipide membranaire, et des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) (Katsinelos et al., 2018). Ces mécanismes de sécrétion ont été principalement identifiés *in vitro*. Il est donc probable qu'une partie d'entre eux permettent une sécrétion physiologique plutôt que pathologique de tau.

De plus, il est intéressant de noter qu'une activité électrique neuronale accrue entraîne une augmentation de la sécrétion de tau de façon physiologique (Barini et al., 2020; Pooler et al., 2013; K. Yamada et al., 2014). Cependant, cela peut être mis en lien avec l'activité épileptique

très présente chez les patients MA (Lehmann et al., 2021) et qui pourrait augmenter la propagation de tau (J. W. Wu et al., 2016).

3.2.2. Mécanismes de capture

Une fois sécrétée, la protéine tau doit être capturée par d'autres cellules pour qu'il y ait une propagation. Cette capture a été observée aussi bien pour des monomères que pour des oligomères *in vivo* (Castillo-Carranza et al., 2014; Takeda et al., 2015) et *in vitro* dans des neurones humains dérivés d'iPSC (Usenovic et al., 2015) et des astrocytes en culture (Martini-Stoica et al., 2018; Piacentini et al., 2017).

Plusieurs études ont montré que l'internalisation de la protéine tau se produit par endocytose indépendante ou médiée par la clathrine, ou par macropinocytose, avec la même efficacité pour les monomères et les formes agrégées (Calafate et al., 2016; Falcon, Noad, McMahon, et al., 2018; Holmes et al., 2013; Michel et al., 2014). Plus récemment, il a été montré que l'internalisation dépendait de la dynamine et de l'actine mais pas de la clathrine dans des lignées cellulaires et des neurones en culture (Soares et al., 2021). L'internalisation des agrégats semble être médiée par les HSPGs (Holmes et al., 2013; Rauch et al., 2018; Stopschinski et al., 2018) ainsi que LRP1, un récepteur de l'APOE (Cooper et al., 2021). La suppression de LRP1 *in vivo* a permis de réduire efficacement la propagation de la protéine tau entre les neurones (Rauch et al., 2020). L'internalisation semble être plus efficace pour les agrégats ou du moins les oligomères de protéines tau plutôt que pour les monomères solubles (Mirbaha et al., 2015; Takeda et al., 2015; J. W. Wu et al., 2013).

3.3. Les vésicules extracellulaires

Au cours des dernières années, les études sur l'implication des vésicules extracellulaires (VEs) dans la propagation de la pathologie tau se sont accumulées. C'est sur cette voie que ce travail de thèse se focalise. Nous allons donc détailler dans les prochains paragraphes les voies de biogénèse et d'internalisation des VEs ainsi que les évidences de leur implication dans la physiopathologie des tauopathies.

Les VEs sont un terme générique pour décrire des particules sphériques constituées d'une bicouche lipidique, générées par les cellules et présentes à l'extérieur de celles-ci. La sécrétion de VEs est un mécanisme très conservé au cours de l'évolution que l'on retrouve aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes. Ainsi, les bactéries, les cellules végétales et toutes les cellules du corps humain libèrent des VEs. Au total, 41 espèces ont déjà été étudiées (www.microvesicles.org).

Il existe une grande diversité de VEs selon leur origine cellulaire, leur biogénèse, leur taille, leur densité, leur contenu, *etc* (**figure 19**). Cependant, elles peuvent être réparties en 3 catégories selon leur biogénèse : les exosomes, les microparticules et les corps apoptotiques (**figure 20**).

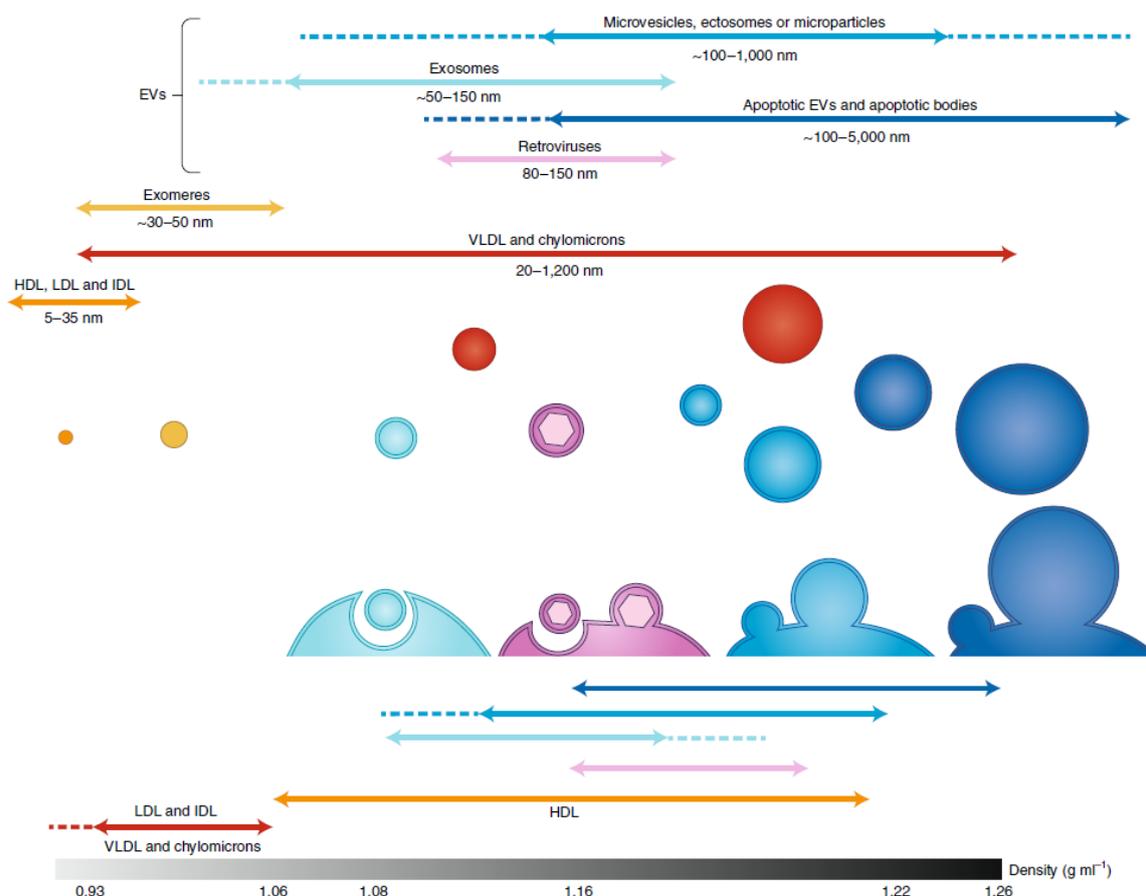


Figure 19 : Caractéristiques physiques des différentes particules sphériques qu'il est possible de retrouver dans les fluides extracellulaires. Les VE se retrouvent mélangés à d'autres types de particules comme les lipoprotéines (HDL, LDL, IDL). La taille et la densité des sous-types de particules se chevauchent ce qui rend difficile leur séparation basée sur des critères physiques. Mathieu et al., 2019.

Les corps apoptotiques sont délimités par une membrane plasmique et sont libérés par les cellules en apoptose. Ils sont considérés comme des grosses VE de 500 à 5000 nm de diamètre selon les types cellulaires étudiés (Cocucci & Meldolesi, 2015; EL Andaloussi et al., 2013; van Niel et al., 2018). Ils contiennent les organites cellulaires qui seront dégradés par les phagocytes ou les cellules microgliales. Ils ne sont donc sûrement pas impliqués dans la communication intercellulaire à proprement parlé.

Les microparticules, initialement appelés « poussières plaquettaires », ont été décrites pour la première fois en 1967 (Wolf, 1967). Elles sont aussi appelées ectosomes ou microvésicules. Le terme « ectosome » dérive de la définition de l'ectocytose introduite en 1991 pour décrire l'excrétion de vésicules de la membrane plasmique des neutrophiles stimulés (Stein & Luzio, 1991). Ces vésicules ont un diamètre généralement compris entre 100 et 1000 nm selon les types cellulaires étudiés (Cocucci & Meldolesi, 2015; EL Andaloussi et al., 2013; van Niel et al., 2018). Elles sont libérées dans le milieu extracellulaire suite au bourgeonnement vers l'extérieur de la membrane plasmique. Bien que les microparticules aient été étudiées principalement pour leur rôle dans la coagulation sanguine (Satta et al., 1994; Sims et al., 1988), elles joueraient un rôle dans la communication intercellulaire de façon générale, aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques, comme par exemple entre les cellules cancéreuses (Al-Nedawi et al., 2008), où elles sont appelées oncosomes.

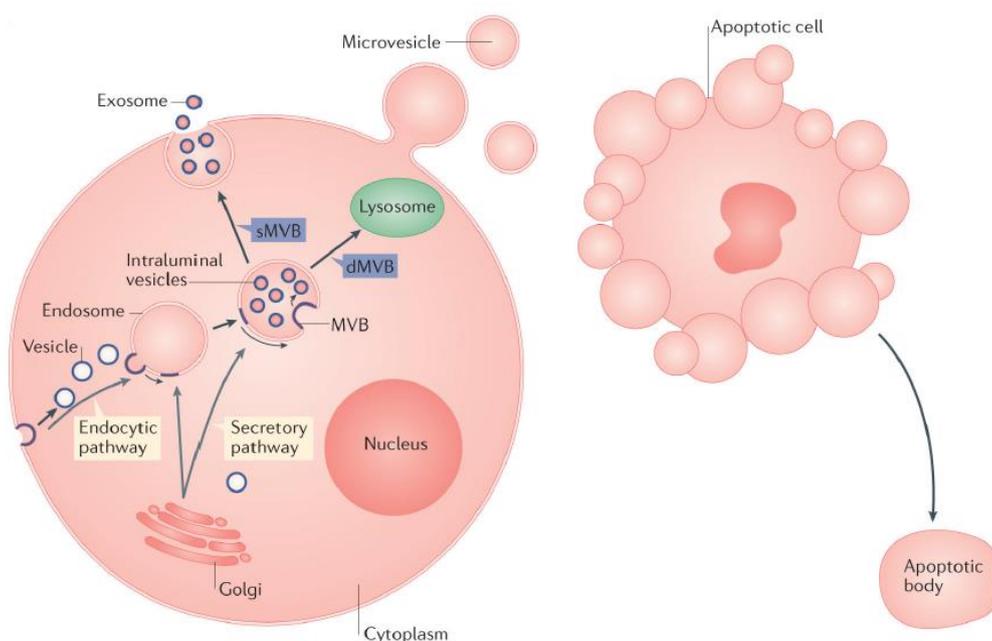


Figure 20: Formation schématique des grandes sous-catégories de vésicules extracellulaires (exosomes, microparticules et corps apoptotiques). Budnik et al., 2016.

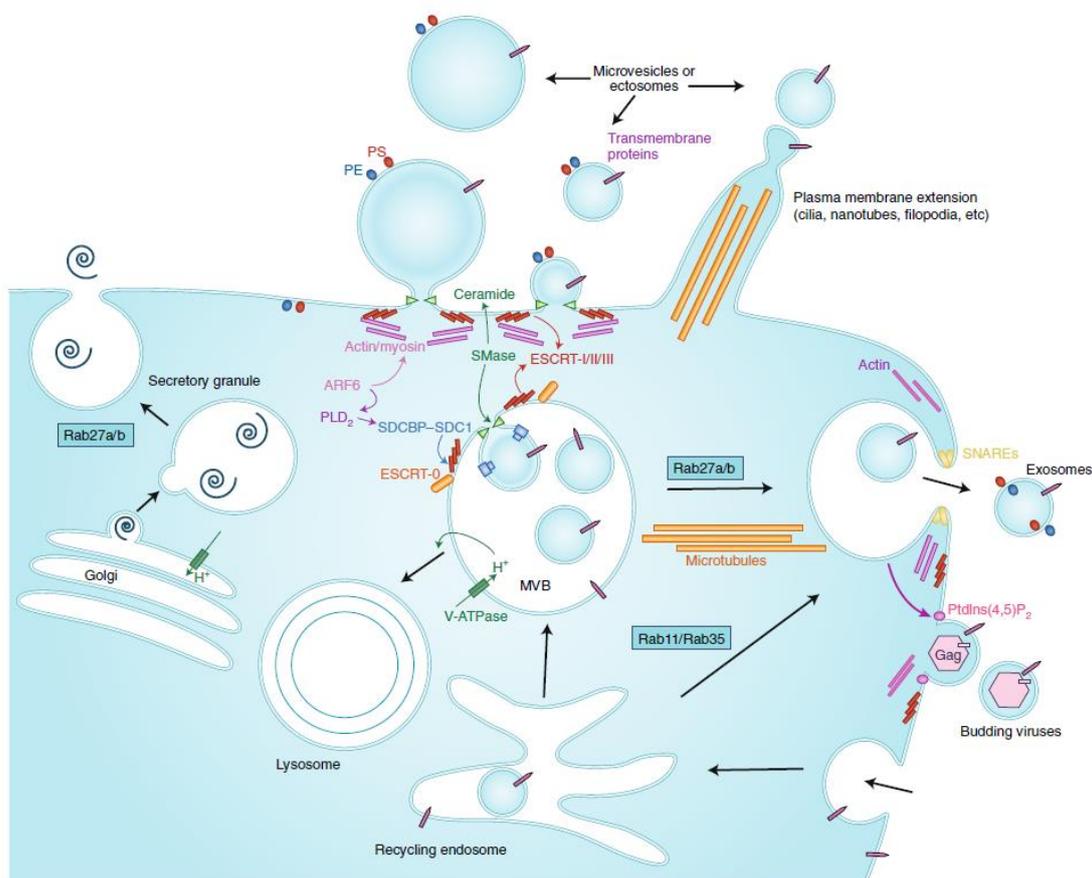
Les exosomes ont quant à eux été identifiés pour la première fois en 1983 dans des réticulocytes par microscopie électronique (Harding et al., 1983; Pan & Johnstone, 1983). Cependant, c'est en 1987 que le mot « exosome » a été utilisé pour décrire des petites vésicules contenues dans des corps multivésiculaires (MVB pour *multivesicular body*) et libérées dans le milieu extracellulaire lors de leur fusion avec la membrane plasmique (Johnstone et al., 1987). Les exosomes sont formés lors de la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs. Le bourgeonnement vers l'intérieur de leur membrane limitante entraîne la formation de vésicules intraluminales (ILV pour *intraluminal vesicles*). L'endosome tardif contenant ces ILV est alors appelé corps multivésiculaire (MVB). Sa fusion avec la membrane plasmique conduit à la libération des ILV dans l'espace extracellulaire, prenant alors le nom d'exosomes. Les MVB peuvent aussi fusionner avec la membrane lysosomale conduisant à la dégradation des ILV et de leur contenu. Les exosomes sont généralement décrits comme plus petits que les microparticules, avec un diamètre de 30 à 150 nm selon les types cellulaires étudiés (Cocucci & Meldolesi, 2015; EL Andaloussi et al., 2013; van Niel et al., 2018).

Les exosomes ont d'abord été considérés comme un mécanisme d'élimination de composants cellulaires inutiles pendant la maturation des réticulocytes en érythrocytes (Harding et al., 1983; Pan & Johnstone, 1983). Cependant, en 1996, une étude sur les lymphocytes B a montré que les exosomes pouvaient stimuler la réponse immunitaire adaptative (Raposo et al., 1996). Depuis, un grand nombre d'études a confirmé que les microparticules et les exosomes n'étaient pas une simple voie de dégradation mais bien un mécanisme de communication intercellulaire. Leur capacité à déclencher des changements phénotypiques dans les cellules a fait accroître leur intérêt. Les VEs permettent l'échange de protéines, de lipides et d'acides nucléiques entre les cellules. Selon les bases de données actuelles, plus de 41 860 protéines, 4 946 ARN et 1 116 molécules lipidiques ont été détectés dans les VEs humaines (www.exocarta.org). Cependant, les techniques d'isolement des VEs ne

sont pas optimales et conduisent à une co-isolation des VEs avec de multiples contaminants, il est donc important de rester prudent face à ces chiffres. Néanmoins, il a bien été montré que les exosomes pouvaient contenir des ARNm et des micro-ARN fonctionnels qui, lorsqu'ils sont transférés dans des cellules, peuvent être traduits en protéine (Valadi et al., 2007). Les microparticules sont aussi capables de transférer des protéines fonctionnelles et des acides nucléiques modifiant la cellule receveuse (Ratajczak et al., 2006; Skog et al., 2008; Torralba et al., 2018). Dans le SNC, les VEs sont impliquées dans un grand nombre de fonctions physiologiques mais aussi pathologiques (**pour revue : voir Annexe pages 247 à 256**).

3.3.1. Mécanismes de biogénèse et de sécrétion vésiculaire

Différents mécanismes sont impliqués dans la biogénèse des VEs (**figure 21**). Le complexe de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT pour *endosomal sorting complex required for transport*) a été initialement décrit dans la formation des ILV (Hurley, 2008). Les ESCRT sont impliqués dans le recrutement des cargaisons vésiculaires, le remodelage des membranes, leur bourgeonnement et leur scission pour former les vésicules. La machinerie ESCRT regroupe plus de 30 protéines qui s'associent en complexes successifs (ESCRT-0, -I, -II et -III) au niveau de la membrane et qui agissent par étapes (Cocucci & Meldolesi, 2015; van Niel et al., 2018). Les complexes ESCRT-0 et ESCRT-I lient et regroupent les protéines ubiquitylées (normalement destinées à être dégradées) au niveau des microdomaines de la membrane limitante des endosomes. Le recrutement de l'ESCRT-II et l'ESCRT-III ainsi que de leurs protéines associées permet le bourgeonnement puis la scission de la membrane (van Niel et al., 2018). La protéine ALIX recrute des désubiquitinases dans le complexe ESCRT-III pour éliminer l'ubiquitine des cargaisons protéiques (Bissig & Gruenberg, 2014; Buschow et al., 2005; Clague et al., 2012; Colombo et al., 2013; Hurley & Odorizzi, 2012). La protéine VPS4 désassemble ensuite l'ESCRT-III polymérisée (EL Andaloussi et al., 2013).



(figure page précédente)

Figure 21 : Mécanismes de biogénèse des VEs. Implication des composants de la machinerie ESCRT et de la céramide au niveau du MVB et de la membrane plasmique pour la formation des microparticules. L'exposition des récepteurs sur les ILV est identique à celle de la surface cellulaire exposant les domaines extracellulaires des protéines transmembranaires aussi bien dans les exosomes que les microparticules. Rab27a/b sont impliqués dans la sécrétion d'exosomes mais aussi dans la libération des virus et des granules de sécrétion dérivés de l'appareil de Golgi. L'ARF6 et la dépolymérisation de l'actine du cytosquelette sont nécessaires pour la sécrétion des VEs en général. À l'inverse, l'acidification des MVB par la V-ATPase peut être un mécanisme de contrôle spécifique à la sécrétion d'exosomes. *Abréviations : PE = Phosphatidyléthanolamine, PS = Phosphatidylsérine, PLD2 = phospholipase D2, SDC1 = syndécan-1, SDCBP = synténine-1.* Mathieu et al., 2019.

La présence de protéines associées à cette machinerie comme TSG101 ou ALIX dans les préparations vésiculaires sont souvent considérées comme la preuve de leur origine MVB. Les facteurs ESCRT sont impliqués dans divers événements de bourgeonnement et de scission des membranes (Engelenburg et al., 2014) notamment au niveau de la membrane plasmique, qui nécessitent ESCRT-I, II et III et leurs protéines associées (Hurley, 2015), et conduit à la libération des microparticules (Nabhan et al., 2012). Les composants de l'ESCRT-0 ne sont généralement pas décrits dans les modèles de bourgeonnement et de libération de la membrane plasmique (Mathieu et al., 2019). Ainsi, la présence de protéines liées à l'ESCRT-0 dans les préparations vésiculaires pourrait être un moyen de démontrer leur origine MVB (Colombo et al., 2013).

En plus de l'ESCRT, qui reconnaît les protéines ubiquitylées, d'autres mécanismes indépendants de l'ESCRT peuvent permettre de générer des exosomes et des microparticules (van Niel et al., 2018). La céramide, produite à partir de sphingomyéline hydrolysée par l'enzyme sphingomyélinase neutre (Bianco et al., 2009; Trajkovic et al., 2008), favorise le bourgeonnement membranaire en raison de sa structure conique. Il a été démontré que l'inhibition de la sphingomyélinase neutre empêche le bourgeonnement des ILV dans les MVB et la libération d'exosomes dans des lignées oligodendrocytaires (Trajkovic et al., 2008). En revanche, la synthèse de céramide favorise la sécrétion des microparticules par la microglie (Antonucci et al., 2012).

La biogénèse des microparticules nécessite également des réarrangements des composants lipidiques et protéiques de la membrane plasmique ainsi que des mécanismes enzymatiques dépendants du taux de calcium (van Niel et al., 2018; You & Ikezu, 2019). Parmi les lipides, le cholestérol est très présent dans les microparticules et sa réduction pharmacologique entraîne une diminution de leur sécrétion (Del Conde et al., 2005).

En plus des lipides, des éléments du cytosquelette et des protéines qui leur sont associés sont nécessaires à la biogénèse des VEs. Par exemple, les GTPases RHO et ARF6 qui régulent les réarrangements du cytosquelette, sont impliquées dans la formation des microparticules (Li et al., 2012; Muralidharan-Chari et al., 2009). Les GTPases Rab sont quant à elles impliquées dans le trafic des MVB vers la membrane plasmique (Hsu et al., 2010; Ostrowski et al., 2010). La fusion des MVB avec la membrane plasmique peut notamment faire appel aux Rab27a, Rab11 et Rab31 (Ostrowski et al., 2010). Les protéines SNARE, associées à la face cytoplasmique des membranes, jouent également un rôle dans la fusion des MVB avec la membrane plasmique. La libération des microparticules quant à elle nécessite une scission de la membrane plasmique. Ce mécanisme dépend, en partie, de l'interaction de l'actine et de la myosine ainsi qu'une

contraction permise par l'ATP (van Niel et al., 2018). La sécrétion des exosomes nécessite des étapes supplémentaires d'adressage à la membrane plasmique et de fusion qui ne sont pas nécessaires pour les microparticules. Leur libération serait donc probablement plus rapide.

3.3.2. Mécanismes d'internalisation

Une fois libérées dans le milieu extracellulaire, les VEs peuvent atteindre d'autres cellules pour y délivrer leur contenu et entraîner des modifications fonctionnelles. Plusieurs voies d'internalisation ont été mises en évidence (figure 22). Tout d'abord, elle peut se faire via une interaction entre des protéines présentes à la surface des VEs et des récepteurs présents au niveau de la membrane des cellules receveuses. Les tétraspanines, les intégrines (Antonyak et al., 2011; Hoshino et al., 2015; Morelli et al., 2004), les lipides, les lectines, les HSPG (Christianson et al., 2013) ou encore les composants de la MEC peuvent permettre cette interaction. Les VEs peuvent ensuite rester à la surface sans délivrer leur contenu mais en ayant tout de même un effet sur la cellule. C'est par exemple le cas lorsque les complexes majeurs d'histocompatibilité présents à la surface des VEs permettent, via des récepteurs, d'activer les lymphocytes T7 lors de la réponse immunitaire (Tkach et al., 2017). Les VEs peuvent aussi être internalisées par endocytose médiée par la clathrine, les cavéoles ou les radeaux lipidiques. Elles peuvent aussi être internalisées par phagocytose, macropinocytose ou micropinocytose qui ne dépendent pas d'interactions spécifiques (van Niel et al., 2018). Les VEs peuvent également libérer leur contenu suite à leur fusion avec la membrane plasmique. Cette fusion est médiée par des fusogènes tels que la syncytine-1.

Selon leur taille et leur composition, les voies d'internalisation peuvent varier. Par exemple, la micropinocytose est en théorie compatible avec la capture des petites VEs comme les exosomes mais pas avec celle des microparticules (Mulcahy et al., 2014). De plus, la question de savoir si le ciblage cellulaire par les VEs est spécifique ou générique est importante. Les données appuient les deux possibilités. Par exemple, la macropinocytose et la micropinocytose sont plutôt décrites comme étant non spécifiques. Le transfert inter-espèces de VEs, de l'Homme à la souris par exemple, peut également faire penser à un ciblage plutôt générique des VEs (Valadi et al., 2007). Aucun récepteur n'a été établi comme un véritable récepteur vésiculaire suffisant et/ou nécessaire pour l'internalisation des VEs. Cependant, de nombreux sous-types vésiculaires partagent des protéines de surface communes et il est possible que l'une d'elle agisse comme un ligand général pour un récepteur, permettant l'internalisation des VEs, de manière similaire au mécanisme d'absorption des LDL (M. S. Brown & Goldstein, 1974). De plus, les voies d'internalisation pourraient dépendre aussi bien des caractéristiques des VEs que de celles des cellules receveuses, notamment par rapport aux récepteurs présents à leurs surfaces. Il a d'ailleurs été montré que l'internalisation des VEs pouvait dépendre d'une interaction spécifique entre un ligand et un récepteur dans des cellules cancéreuses (Berenguer et al., 2018). Un ciblage spécifique semble en effet plus pertinent. Par exemple, les VEs de neuroblastome semblent être endocytées de manière sélective par les cellules gliales, alors que les VEs libérées des neurones sont internalisées de préférence par d'autres neurones (Chivet et al., 2014). Les VEs libérées par les plaquettes sont transférées aux monocytes mais pas aux neutrophiles (Lösche et al., 2004). De plus, les VEs d'origine différente peuvent induire des effets variés dans un même type de cellule (Eken et al., 2013; Sadallah et al., 2011). Les différentes protéines exposées à la surface des VEs et de leurs cellules cibles restent largement inconnues, mais il s'agit d'un domaine d'investigation actif. Ces caractéristiques pourraient notamment expliquer, du moins en partie, la vulnérabilité cellulaire observée dans les tauopathies.

Une fois internalisées, le devenir des VEs et de leurs cargaisons ainsi que les conséquences fonctionnelles peuvent être multiples : dégradation, re-sécrétion, impact des voies de signalisation, modification de l'état de la cellule, *etc.* Leur devenir est néanmoins peu documenté pour le moment car les recherches dans ce domaine sont récentes et la diversité vésiculaire commence à peine à être prise en compte.

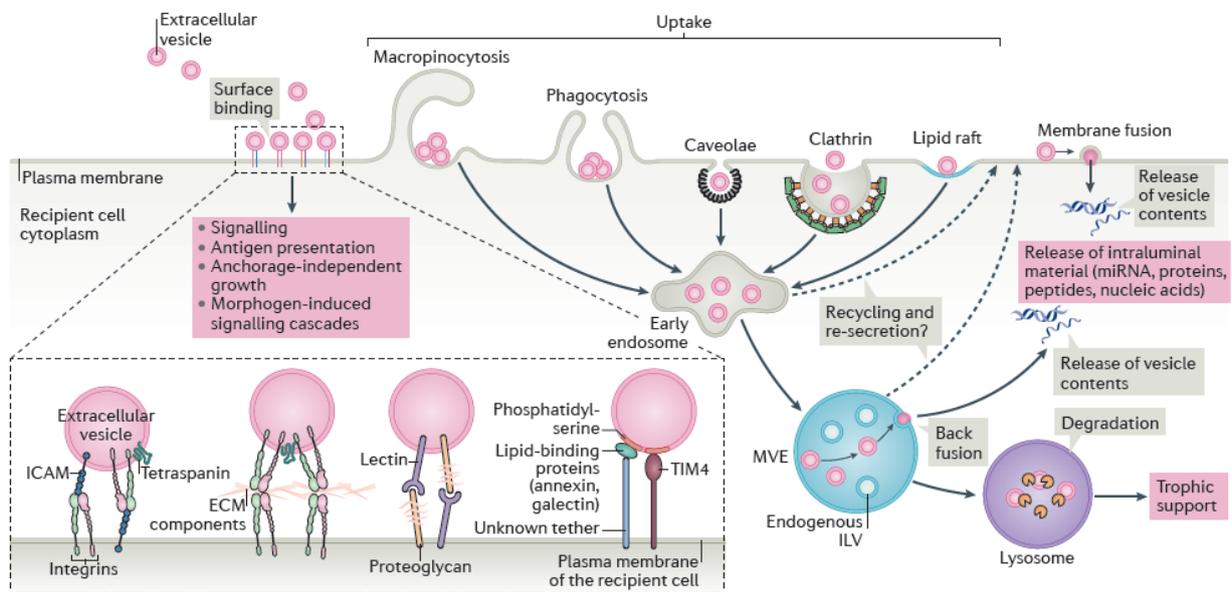


Figure 22 : Mécanismes d'internalisation des vésicules extracellulaires. Les VEs peuvent se fixer à la surface cellulaire (encadré en pointillé) et y rester, tout en induisant des voies de signalisation intracellulaire, ou bien, être internalisées par différentes voies. Leur endocytose peut être médiée par la clathrine, ou facilitée par la présence de radeaux lipidiques ou de cavéoles (sous-types de radeaux lipidiques enrichis en glycosphingolipides et en cholestérol). Les VEs peuvent aussi être phagocytées ou internalisées par micro- ou macropinocytose. Enfin, elles peuvent fusionner avec la membrane plasmique libérant ainsi directement leur contenu dans le cytoplasme de la cellule receveuse. Après leur internalisation, les VEs peuvent être envoyées vers le lysosome pour être dégradées ou être à nouveau sécrétées après fusion du MVB avec la membrane plasmique. *Abréviations : ECM = matrice extracellulaire, ICAM = molécule d'adhésion intercellulaire.* van Niel et al., 2018.

3.3.3. Techniques d'isolement

Les fluides extracellulaires (milieux de cultures cellulaires, plasma, liquide interstitiel, LCS, *etc.*) ne contiennent pas uniquement des VEs. Ils contiennent aussi des protéines sécrétées sous forme libre, des agrégats protéiques, des débris cellulaires, des corps apoptotiques ou encore des lipoprotéines. Pour étudier le rôle des VEs, il est donc essentiel d'éliminer ces « contaminants ». Plusieurs techniques permettent d'enrichir les VEs mais aucune ne permet d'obtenir une préparation totalement pure notamment à cause du recouvrement en taille et en densité de tous ces composants. Cette limite technique est donc à prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

Parmi les techniques d'isolement vésiculaire les plus utilisées, il y a l'ultracentrifugation différentielle, les gradients de densité et la chromatographie par exclusion de taille mais les VEs peuvent aussi être isolées par immunoprécipitation, par précipitation au poly-éthylène-glycol,

par filtration, par cytométrie en flux ou encore par microfluidique. La combinaison de plusieurs techniques est de plus en plus utilisée car elle permet d'obtenir des préparations vésiculaires plus « pures » (Théry et al., 2018). La technique d'isolement choisie doit être adaptée à la composition de chaque fluide qui est différente ainsi qu'à la question scientifique posée.

Avec l'intérêt croissant d'étudier les VEs et pour éviter les conclusions hâtives, une communauté s'est créée et a établi un guide très complet de recommandations pour l'étude rigoureuse des VEs : le MISEV (pour *Minimal information for studies of extracellular vesicles*) (Théry et al., 2018). Il recommande notamment de caractériser à l'aide de plusieurs techniques les VEs et les « contaminants » présents dans les préparations vésiculaires.

3.3.4. Limites dans l'étude des VEs

Parce que la plupart des rapports publiés sur les VEs se sont concentrés sur leurs fonctions potentielles plutôt que sur leurs origines, on ne sait toujours pas quelle sous-population vésiculaire est responsable d'un effet donné. Les protocoles actuellement disponibles pour récupérer les VEs aboutissent à une population hétérogène de VEs d'origine inconnue (Willms et al., 2016). À l'heure actuelle, il n'existe d'ailleurs pas de marqueurs spécifiques des exosomes ni des microparticules. Du fait de leur recouvrement en taille et en densité, de leur orientation membranaire identique, du manque de spécificité des mécanismes de biogénèse, ou du modèle étudié, rien ne permet d'être certain de leur origine vésiculaire. Il est souvent décrit que les exosomes sont enrichis en tétraspanines telles que CD63, CD81 et CD9 (Kowal et al., 2016), en flotiline, en composants des ESCRT ou en protéines TSG101 et ALIX mais aucune de ces protéines n'est purement spécifique aux exosomes. Cela peut dépendre notamment du type cellulaire qui génère les VEs.

Ces limites empêchent également de concevoir une nomenclature plus précise des exosomes et des microparticules prenant davantage en compte leur diversité (Gould & Raposo, 2013; Kowal et al., 2016). La cellule donneuse, son état physiopathologique, son environnement, le moment et les techniques d'analyse peuvent influencer la sécrétion vésiculaire. Les conclusions sont donc très dépendantes des conditions expérimentales et du modèle étudié.

De plus, au-delà de la différenciation entre exosomes et microparticules, les différentes protéines impliquées dans la biogénèse des VEs ou retrouvées dans ces dernières ne sont pas nécessairement spécifiques aux voies vésiculaires et peuvent être impliquées dans d'autres fonctions dans la cellule, c'est notamment le cas de la protéine tau. La présence de ces protéines n'est donc pas nécessairement synonyme de la présence de VEs.

Enfin, les exosomes sont souvent décrits comme étant plus petits que les microparticules. Ce terme est donc employé à tort dans beaucoup d'études. À moins d'avoir démontré leur origine MVB, il est préférable d'utiliser le terme générique de « petites VEs » (Théry et al., 2018). De plus, les ILV peuvent fusionner entre elles dans le MVB donnant naissance à des VEs plus grandes dont la taille se chevauche avec celles des microparticules, qui ne sont pas forcément de grande taille. Il est donc recommandé de parler de petites ou de grosses VEs lorsque leur origine n'est pas identifiée avec certitude.

3.3.5. Implication des VEs dans la propagation de la pathologie tau

Dans plusieurs maladies neurodégénératives, les VEs transportent les protéines amyloïdes pathologiques, enrichies soit à la surface des VEs comme pour le prion ou l'A β , soit présente à l'intérieur des VEs comme TDP-43 ou l' α -synucléine (L. Cheng et al., 2018; Coleman & Hill, 2015), mais qu'en est-il pour la protéine tau ?

L'association de tau avec la membrane plasmique est connue depuis de nombreuses années (Brandt et al., 1995; S. Lee et al., 2012), indiquant une prédisposition de tau à se trouver dans les microparticules. De plus, étant donné que leur libération est facilitée par des médiateurs tels que le calcium, des molécules inflammatoires ou le stress oxydatif, qui sont impliqués dans la physiopathologie des tauopathies (Baron et al., 2012; Doeuvre et al., 2009), elles pourraient être de bons candidats en tant que mécanisme de sécrétion de la protéine tau en conditions pathologiques. Dans des cultures primaires de neurones, tau est d'ailleurs retrouvée davantage à l'intérieur des microparticules que des exosomes (Dujardin, Bégard, et al., 2014). De plus, il a été rapporté que, dans les exosomes, tau était colocalisée avec la kinase Fyn associée aux radeaux lipidiques (S. Lee et al., 2012). Plus récemment, la sécrétion d'exosomes contenant la protéine tau a été rapportée dans des neurones primaires et des lignées cellulaires N2A la surexprimant (Y. Wang et al., 2017). La présence de tau dans les VEs a été confirmée dans de nombreux modèles et fluides biologiques (Asai et al., 2015; Dujardin, Bégard, et al., 2014; Guix et al., 2018; Saman et al., 2012; Simón et al., 2012; Y. Wang et al., 2017). Son transfert inter-neuronal via les VEs a également été démontré *in vitro* (Guix et al., 2018; Polanco et al., 2018; Y. Wang et al., 2017).

Contrairement à la protéine tau présente librement dans l'espace extracellulaire, celle présente dans les VEs est retrouvée phosphorylée sur plusieurs résidus (Díaz-Hernández et al., 2010; Polanco et al., 2016). La protéine tau étant à l'intérieur des VEs, elle est protégée des éventuelles phosphatases présentes dans l'ISF. La protéine entière, donc contenant les hexapeptides nécessaires à son agrégation, est retrouvée dans les VEs neuronales dérivées d'iPSC, de LCS et de plasma humains (Guix et al., 2018). De plus, il a été montré que les exosomes véhiculent certains lipides qui accélèrent la formation des structures amyloïdes (Yuyama et al., 2008). Des VEs isolées à partir de cerveaux de souris exprimant la protéine tau humaine mutée P301L contiennent des espèces pro-nucléantes (Polanco et al., 2016). L'injection de ces VEs dans le cerveau de souris ALZ17 a entraîné une augmentation de la phosphorylation et de l'oligomérisation de la protéine tau endogène (Baker et al., 2016). De plus, il a été montré que les cellules microgliales participaient à la propagation de la pathologie via la sécrétion d'exosomes contenant tau. L'inhibition de la biogenèse des exosomes dépendante de la céramide par le blocage de la sphingomyélinase neutre a réduit la propagation de la protéine tau dans ce modèle (Asai et al., 2015). Enfin, très récemment, il a été montré que des VEs isolées à partir de cerveaux de patients MA contenaient des espèces oligomériques pro-nucléantes de protéine tau. Une fois injectées dans le cerveau de souris sauvages âgées, une accumulation de protéine tau anormalement phosphorylées a pu être observée. Il est important de noter que cet effet n'a pas pu être observé suite à l'injection de la même concentration des formes oligomériques ou fibrillaires de protéine tau non vésiculaire et issus du même patient (Ruan et al., 2021).

Prises ensemble, ces études semblent indiquer que les VEs contenant la protéine tau peuvent jouer un rôle important dans la propagation de la pathologie à travers le cerveau.

3.4. Devenir de la protéine tau après son internalisation

Une fois internalisée dans la cellule receveuse, la protéine tau peut simplement être dégradée l'empêchant ainsi de propager la pathologie. La dégradation des protéines et notamment de la protéine tau peut se faire dans le lysosome ou le protéasome (Y. Wang et al., 2009; J. Y. Zhang et al., 2005). Toutefois, en conditions pathologiques comme dans la MA, les voies de dégradation sont modifiées et par conséquent, la clairance tau est altérée (Jiang & Bhaskar, 2020; M. J. Lee et al., 2013). De plus, les modifications endolysosomales sont parmi les premières altérations cellulaires dans la MA (Cataldo et al., 2000) et ont été décrites comme étant un moteur central dans la propagation de nombreuses protéines amyloïdes (Hu et al., 2015; Schreij et al., 2016; Small et al., 2017). Par exemple, après leur internalisation, les agrégats de tau peuvent induire une rupture de la membrane endosomale atteignant ainsi le cytoplasme et évitant le transport jusqu'aux lysosomes (Calafate et al., 2016; Falcon, Noad, McMahon, et al., 2018; Flavin et al., 2017). La fuite endolysosomale d'espèces pro-nucléantes de protéine tau a été confirmée par une autre étude récente qui souligne l'impact sur la propagation de la pathologie (J. J. Chen et al., 2019). Le facteur de risque génétique de la MA, BIN1, régule négativement la voie endocytaire. Sa perte de fonction entraîne une augmentation de l'internalisation des agrégats de protéine tau qui s'échappent des endosomes pour propager la pathologie (Calafate et al., 2016). Le facteur de risque CHMP2B est aussi impliqué dans la voie endolysosomale (Skibinski et al., 2005).

Concernant les VEs, il a été montré que les exosomes endocytés contenant la protéine tau échappent à la voie endosomale pour se propager vers d'autres neurones (Polanco et al., 2018) mais peuvent aussi induire une perméabilisation de l'endolysosome conduisant à une libération des espèces pro-nucléantes dans le cytoplasme et à une agrégation de tau (Polanco et al., 2021). Les formes libres comme vésiculaires de la protéine tau peuvent être internalisées par endocytose et entraîner notamment des dommages des voies endolysosomales conduisant à une disponibilité des espèces pro-nucléantes dans la cellule receveuse. Il est donc essentiel de comprendre quelle est la forme privilégiée dans la propagation de la pathologie tau, ou bien, si les deux interviennent, dans quelle mesure selon le temps, les réseaux cellulaires et les tauopathies.

IV- De la mécanistique au diagnostic : la place des VEs

1. À la recherche de biomarqueurs

Un biomarqueur traduit un changement biologique mesurable qui reflète indirectement un processus biologique. Dans notre cas, ce processus implique la formation d'inclusions de protéines tau dans le cerveau. Dans les tauopathies, comme dans la plupart des maladies neurodégénératives, la formation des lésions débute plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes. Il est donc important de pouvoir identifier les patients le plus précocement possible en développant des biomarqueurs sensibles et spécifiques à chaque maladie pour ainsi pouvoir proposer une prise en charge et un traitement adaptés avant que la pathologie ne se soit trop développée. Bien qu'aucun traitement ne soit encore disponible pour les tauopathies, il est toutefois nécessaire d'avancer sur les deux fronts.

Les deux fluides principalement étudiés pour le diagnostic sont le LCS, prélevé par ponction lombaire, et le plasma, isolé à partir du sang. Selon une estimation, environ 20% du LCS proviendrait de l'ISF (Edsbatge et al., 2004; Pérez-Fígares et al., 2001). Quant au système vasculaire, il est très dense dans le système nerveux mais le sang circule également à travers tout le corps allant à la rencontre de chacun de nos organes. Les composés qui passent du cerveau au sang se retrouvent donc dilués de façon beaucoup plus importante que dans le LCS. Pour autant, il présente des avantages majeurs par rapport au LCS à commencer par la technique de prélèvement plus rapide et moins invasive. Ainsi, les biomarqueurs sanguins pourraient être utilisés à grande échelle pour le dépistage et le suivi mais ils nécessitent des technologies plus sensibles et spécifiques pour être identifiés (Blennow, 2017). Dans cette partie, nous aborderons également l'intérêt potentiel des VEs et de leur contenu dans l'identification de biomarqueurs.

2. Mécanismes de drainage de l'ISF dans le LCS et le sang

Pour identifier un biomarqueur dans les fluides périphériques reflétant la pathologie qui se développe dans le cerveau, il doit y avoir un passage de composés du cerveau vers ces fluides. Dans un contexte de propagation via le milieu extracellulaire, nous allons voir par quels mécanismes les composants de l'ISF (VEs, protéines, etc.) peuvent passer dans le LCS et le sang.

Plusieurs voies permettant le drainage de l'ISF ont été mises en évidence *in vivo* grâce à l'utilisation de traceurs en IRM ou de sondes fluorescences en microscopie bi-photonique (Han et al., 2014; Lei et al., 2017; Shetty & Zanirati, 2020). Dans les deux premières, il y a un échange direct entre l'ISF et le LCS. Les macromolécules de l'ISF peuvent traverser les jonctions serrées des cellules épendymaires qui tapissent la paroi interne des ventricules (Han et al., 2012; Johanson et al., 2011; A. Wang et al., 2019) (**figure 23, A**). De plus, à la surface du cerveau et de la moelle épinière, l'ISF peut rejoindre l'espace sous-arachnoïdien en passant à travers les membranes limitantes gliales et la pie-mère (Iliff et al., 2012; H. Pollock et al., 1997) (**figure 23, B**). Enfin, l'ISF peut s'écouler le long des vaisseaux sanguins au niveau de la membrane basale pour rejoindre le système glymphatique (Abbott, 2004; Bradbury et al., 1981; Carare et al., 2008; Iliff et al., 2012) (**figure 23, C**). Cette voie est particulièrement active pendant le sommeil. Par exemple, la clairance des peptides β -amyloïde est multipliée par deux par rapport à l'état de veille (Rasmussen et al., 2018). Dans la MA, il est notamment décrit des altérations du sommeil et du système glymphatique (Jessen et al., 2015).

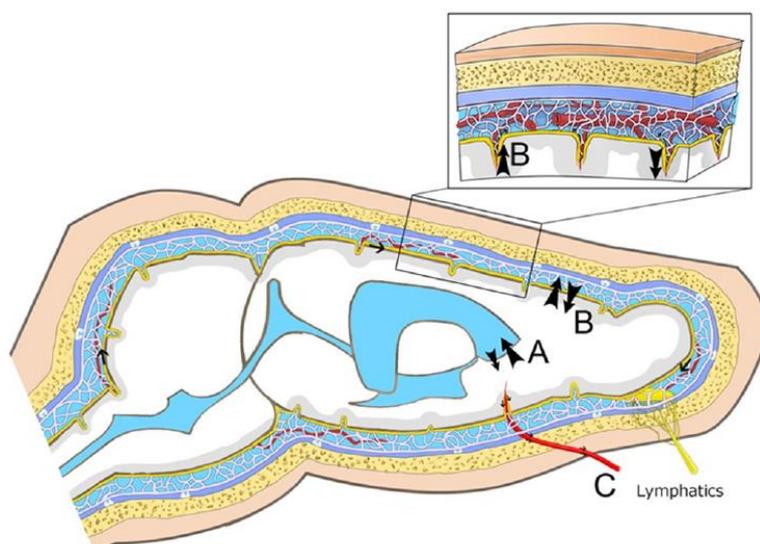
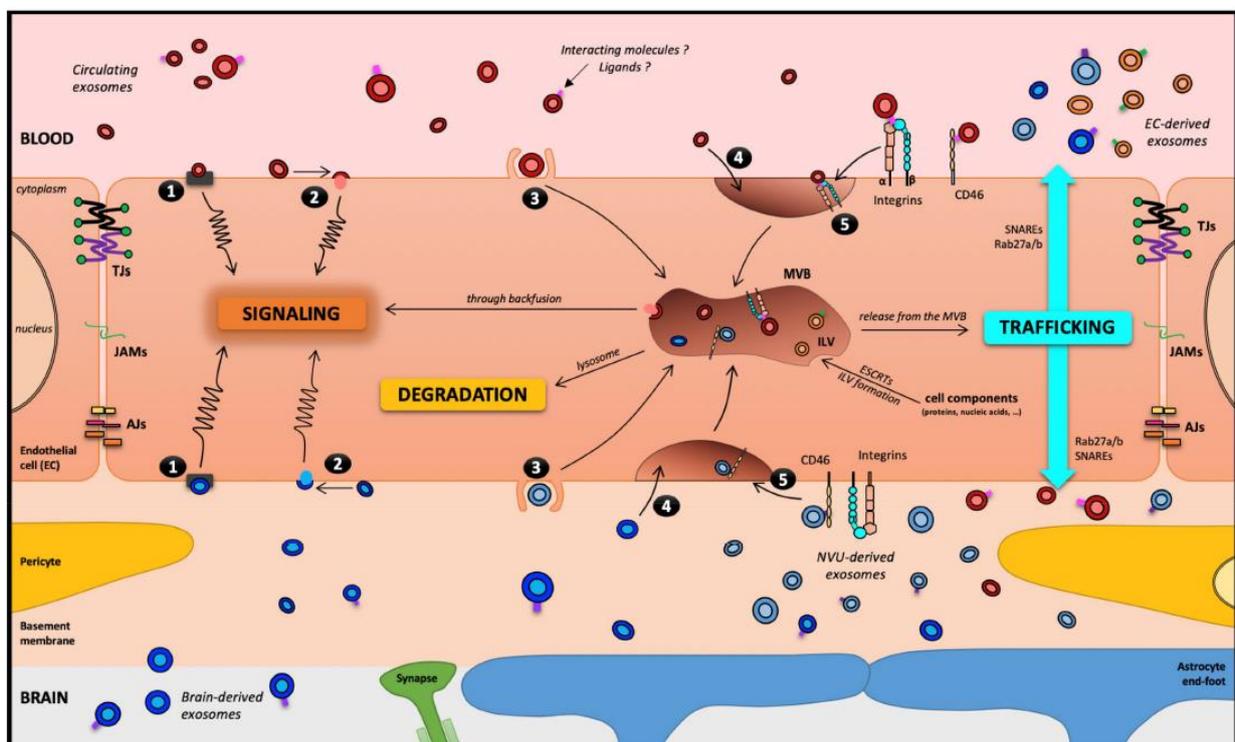


Figure 23 : Voies de drainage de l'ISF vers le LCS. (A) Passage au niveau des cellules épendymaires qui tapissent les ventricules. (B) Drainage vers l'espace sous-arachnoïdien entourant le cerveau. (C) Écoulement le long des vaisseaux sanguins pour rejoindre le système glymphatique. Ces voies sont schématisées dans un cerveau de souris. Lei et al., 2017.

Les VEs pourraient emprunter ces différentes voies mais à l'heure actuelle, aucune donnée mécanistique ne permet de le confirmer. Néanmoins, certaines études ont permis de mettre en évidence des mécanismes potentiels de passage des VEs à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE est une barrière perméable hautement sélective entre le SNC et le sang, formée par les cellules endothéliales des capillaires sanguins reliées par des jonctions serrées, les péricytes et les pieds astrocytaires (Cai et al., 2018). La BHE permet le passage d'eau, de petites molécules hydrophobes (O_2 , CO_2 , hormones) et de molécules liposolubles par diffusion passive ou simple, ainsi que le transport sélectif de molécules comme le glucose et les acides aminés par diffusion facilitée ou transport actif. Des échanges ont donc lieu entre l'ISF et le sang. Si le transfert des VEs de la périphérie vers le cerveau (Ridder et al., 2014) ainsi que du cerveau vers la périphérie (Fiandaca et al., 2015) a été démontré, les mécanismes permettant ce passage ne sont pas encore très bien compris. Il pourrait se faire par transcytose via des récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales, par macro- ou micropinocytose ou bien au niveau des radeaux lipidiques (C. C. Chen et al., 2016) (figure 24). Tous les mécanismes décrits ici empruntent la voie transcellulaire et non paracellulaire (à travers les jonctions serrées). Cependant, il n'est pas à exclure qu'en conditions pathologiques, cette dernière soit également impliquée du fait d'une altération de la BHE généralement causée par une inflammation (Sweeney et al., 2018). Il a notamment été démontré que les VEs libérées par les cellules cancéreuses détruisent la BHE par l'action de micro-ARN (Tominaga et al., 2015). L'augmentation de la perméabilité de la BHE pourrait faciliter le transport des VEs du SNC vers la périphérie mais aussi celui d'autres protéines ou complexes protéiques.



(figure page précédente)

Figure 24 : Mécanismes potentiels de passage des VEs à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). 5 mécanismes d'interactions des VEs avec les cellules endothéliales de la BHE ont été décrits : (1) association avec un récepteur couplé à une protéine G, (2) adhésion à la surface cellulaire et fusion libérant le contenu des VEs dans le cytoplasme, (3) macropinocytose, (4) radeaux lipidiques, (5) transcytose médiée par des récepteurs. Ce dernier mécanisme peut, ou pas, impliquer le corps multivésiculaire et permet à la VE de conserver son contenu entre le SNC et la périphérie. Son contenu peut également être dégradé ou libéré dans le cytoplasme. Un passage par la voie paracellulaire, c'est-à-dire au niveau des jonctions serrées, n'est pas décrit pour les VEs, du moins en conditions physiologiques. *Abréviations : AJ = Jonctions adhérentes, CE = cellule endothéliale, JAMs = molécules d'adhésion jonctionnelle, NVU = unité neuro-vasculaire, TJ = jonctions serrées.* Saint-Pol et al., 2020.

3. Diagnostic actuel

La présence de tau dans le LCS a été mise en évidence pour la première fois en 1993 (Vandermeeren et al., 1993). Des anticorps monoclonaux ciblant tau ont alors été développés (Goedert et al., 1994; Mercken et al., 1992) pour réaliser son dosage immunoenzymatique (ELISA). L'anticorps AT120, situé dans la partie riche en prolines, a été utilisé en capture et la combinaison des anticorps HT7 et BT2, situés dans la même partie, ont été utilisés en révélation (Hock et al., 1995). Cet ELISA a permis de montrer que la concentration de tau dans le LCS était augmentée dans la MA sporadique et familiale et au stade préclinique de MA. Elle corrèle avec la gravité de la démence (Hock et al., 1995). Ce test est encore utilisé en clinique et en recherche.

Aujourd'hui, des tests ELISA dosant la protéine tau, sa forme phosphorylée en thréonine 181 (ptau-181), et les peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ dans le LCS sont utilisés en clinique pour le diagnostic de la MA. Ils corrèlent avec les lésions tau et $A\beta$ observées à l'autopsie (Tapiola et al., 2009). Au cours de la maladie, la concentration des peptides $A\beta$ diminue dans le LCS car ils sont séquestrés dans les plaques séniles. $A\beta_{1-40}$ étant plus abondant que $A\beta_{1-42}$, il donne une bonne approximation des niveaux d' $A\beta$ (Wiltfang et al., 2007) mais le ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ permet d'évaluer la diminution relative d' $A\beta_{1-42}$ qui peut rester à des niveaux importants malgré la pathologie chez certains patients. Le dosage de la protéine tau est quant à lui un biomarqueur de neurodégénérescence plus qu'un biomarqueur de MA car sa concentration est augmentée aussi lors de traumatismes crâniens et d'accidents vasculaires cérébraux. Par contre, l'augmentation de la concentration de la forme phosphorylée ptau-181 reflète bien la présence d'une MA qu'elle soit typique ou atypique (Graff-Radford et al., 2021). Elle permet de différencier les patients des sujets contrôles à partir du stade du Braak III (Tapiola et al., 2009).

Pour le moment, ces dosages sont réalisés uniquement en cas de suspicion de MA pour faire le diagnostic différentiel car même en absence de traitement curatif cela permet de proposer un suivi adapté. Ils peuvent aussi révéler des profils atypiques difficiles à interpréter. Des facteurs pré-analytiques et analytiques conduisent malheureusement à une variabilité des résultats. Les derniers critères diagnostiques pour la MA ne recommandent pas la recherche de biomarqueurs dans le LCS de façon systématique (McKhann et al., 2011). Elle doit être faite uniquement si elle apporte des bénéfices concrets pour le patient et ne se fait pas sans une proposition de suivi ou de soins adaptés. En 2018, le *National Institute on Aging - Alzheimer's Association* (NIA-AA) a proposé le système de classification ATN des biomarqueurs qui se base

sur un diagnostic purement biologique de la MA (Jack et al., 2018). La maladie est considérée comme un continuum entre un stade asymptomatique à démentiel (figure 25). Toutefois, ces critères sont utilisés uniquement dans le cadre de la recherche même s'ils influencent la pratique clinique.

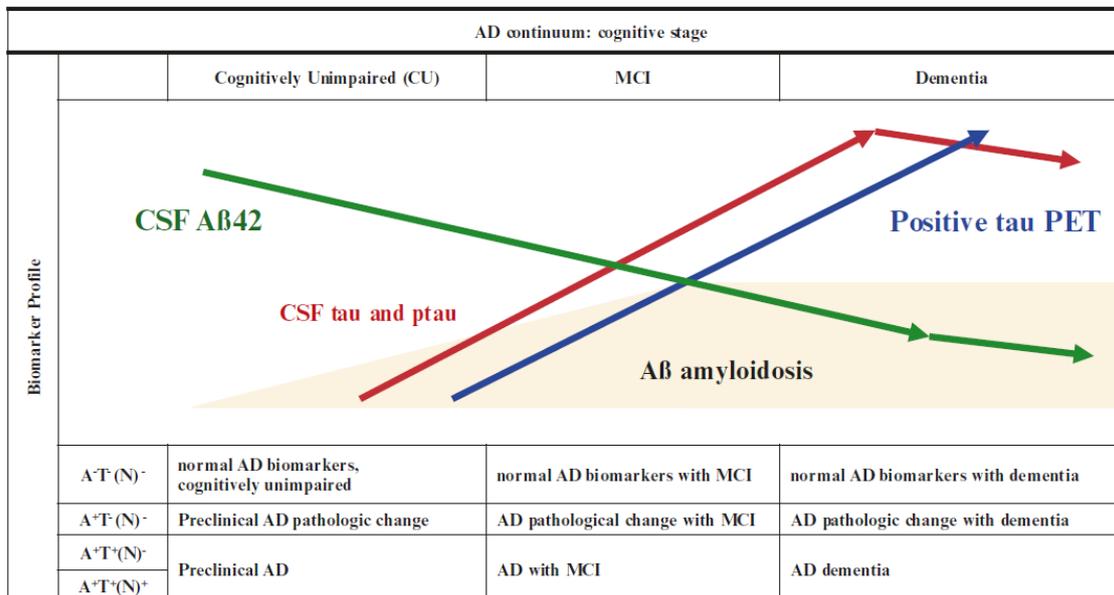


Figure 25 : Critères ATN proposés par la NIA-AA. A : Marqueurs d'agrégation d'Aβ (Aβ₁₋₄₂, Aβ₁₋₄₂/Aβ₁₋₄₀ dans le LCS ou TEP amyloïde). T : Marqueur d'agrégation de tau (ptau dans le LCS ou TEP tau). N : marqueurs de neurodégénérescence ou de mort neuronale (IRM, TEP-FDG, tau dans le LCS, neurofilaments légers). Shoji, 2019.

En France, l'imagerie TEP amyloïde ou tau n'est pas encore autorisée en dehors des protocoles de recherche. La recherche de biomarqueurs dans le LCS est donc le seul outil pour faire un diagnostic biologique de MA, c'est une technique dont la sensibilité ne cesse d'augmenter et qui permet en un seul prélèvement d'avoir un marqueur des deux lésions de la MA pour un coût bien moindre que celui de la TEP.

4. Et dans le futur ?

4.1. Imagerie cérébrale

Une belle avancée a été faite sur le développement de radiotraceurs TEP aussi bien pour la protéine tau que pour le peptide Aβ (Chandra et al., 2019; Matsuda et al., 2019). Ils sont sensibles et semblent spécifiques pour la pathologie étudiée c'est pourquoi ils sont maintenant utilisés dans les études pour évaluer l'efficacité d'un traitement au cours du temps ou bien pour le diagnostic et le pronostic. Ils sont aussi intéressants pour identifier les cas atypiques de MA qui sont difficiles à diagnostiquer. La distribution des dépôts amyloïdes en TEP est similaire entre les phénotypes typiques et atypiques de MA. Cependant, la TEP-tau, la TEP-FDG (métabolisme du glucose) et l'atrophie visible par IRM sont liées au phénotype et donc à la localisation des inclusions de protéines tau (Graff-Radford et al., 2021). Actuellement, l'absence de traitement limite l'intérêt de l'imagerie dans le cadre du soin.

4.2. Sous quelle forme la protéine tau se retrouve-t-elle dans le LCS et le plasma ?

La présence de tau dans le LCS de patients MA a pu être confirmée par spectrométrie de masse où toutes les isoformes ont été identifiées (M. Xu et al., 2021). Différents profils de tau tronquées sont retrouvés dans le LCS en fonction des tauopathies, notamment dans la MA car le profil dans la PSP est semblable à celui des sujets sains (Barthélemy, Gabelle, et al., 2016). Les fragments N-terminaux sont les plus abondants (Jr et al., 2013; Sato et al., 2018). Récemment, la forme phosphorylée en thréonine 217 (ptau-217) s'est montrée plus sensible que la ptau-181 pour discriminer la MA des maladies apparentées et elle corrèle mieux avec les données de TEP-tau (Janelidze, Stomrud, et al., 2020). Il est donc possible qu'elle détrône la ptau-181 dans les dosages diagnostiques de la MA dans le LCS.

Dans le plasma, des dosages de la protéine tau sur deux grandes cohortes ont révélé un chevauchement important entre le vieillissement normal et la MA (Mattsson et al., 2016). L'utilisation de la technologie Simoa®, une technologie d'immunocapture plus sensible que les ELISA commerciaux classiques, a permis de mettre en évidence des concentrations plasmatiques de ptau-181 significativement supérieures chez les patients MA et atteints du syndrome de Down par rapport aux sujets sains (Tatebe et al., 2017). La sensibilité de ptau-181 dans le plasma pour le diagnostic de la MA a été soulignée dans d'autres études récentes et corrèle avec la pathologie tau et A β en TEP (Janelidze, Mattsson, et al., 2020; Karikari et al., 2020; Moscoso et al., 2021; Thijssen et al., 2020). La protéine tau phosphorylée en thréonine 231 (ptau-231) vient également d'être détectée dans le plasma et serait au moins aussi sensible que la ptau-181 pour diagnostiquer précocement la MA (Ashton et al., 2021). Une étude longitudinale a également montré une augmentation de la concentration plasmatique de ptau-217 qui corrèle avec l'aggravation de l'état cognitif et l'atrophie cérébrale (Mattsson-Carlgrén et al., 2020). Son dosage pourrait donc être un biomarqueur précoce de la MA, aussi sensible et spécifique que les biomarqueurs actuels du LCS (Palmqvist et al., 2020).

Il est important de préciser que ces formes de tau reflètent les processus pathologiques en place dans le cerveau puisqu'ils permettent de discriminer les sujets sains des patients. Pour autant, cela ne signifie pas qu'elles sont directement impliquées dans la propagation et l'agrégation de tau.

4.3. La place des VEs

De plus en plus d'études s'intéressent aux VEs comme biomarqueur diagnostique et pronostic dans diverses pathologies (Hoshino et al., 2020; Pang et al., 2020; Yousif et al., 2021) y compris les maladies neurodégénératives (Gámez-Valero et al., 2019; Monteiro-Reis et al., 2021). Étant retrouvées dans le LCS et le plasma, les VEs pourraient refléter l'état physiopathologique des cellules qui les sécrètent, et contenir des protéines et des ARN qui pourraient servir de biomarqueurs. Par exemple, chez les patients ayant eu une hémorragie sous-arachnoïdienne anévrismale, les concentrations d'interleukine-6 associées aux VEs sont plus élevées que chez les sujets contrôles et corrèlent avec la sévérité de la pathologie (Y. Yao et al., 2021). Elles pourraient ainsi servir de biomarqueur pronostic. Une autre étude préliminaire montre que les protéines associées aux VEs pourraient servir de biomarqueurs précoces pour prédire les formes graves de la COVID-19 (Fujita et al., 2021). Quant à la protéine tau et ptau-181, elles ont été détectées dans des VEs isolées à partir de LCS de patients MCI et MA (Saman et al., 2012; Y.

Wang et al., 2017). Tau a également été identifiée dans des VEs plasmatiques de patients atteints d'encéphalopathie traumatique chronique (Stern et al., 2016). Une autre étude longitudinale montre la présence de ptau-181, ptau-396 et A β ₁₋₄₂ dans des VEs sanguines d'origine neuronale, immuno-isolées à l'aide d'anticorps anti-L1CAM ou anti-NCAM. Elles pourraient prédire le développement de la MA jusqu'à 10 ans avant l'apparition des symptômes (Fiandaca et al., 2015). D'autres études confirment la présence de la protéine tau et ptau dans les VEs neuronales plasmatiques permettant de faire la différence entre les patients MA, MCI et les sujets contrôles (Jia et al., 2019; Winston et al., 2016). De plus, d'autres protéines pourraient servir de biomarqueur de la MA. Les concentrations de protéines synaptiques associées aux neurones excitateurs sont plus faibles dans les VEs neuronales plasmatiques des patients MA et aux stades précliniques comparativement aux sujets contrôles et, cela corrèle avec l'évolution du déclin cognitif (Goetzl et al., 2018). Toujours dans ces VEs, les concentrations de certaines protéines lysosomales (Goetzl et al., 2015) et associées à la réponse à l'insuline cérébrale (Mullins et al., 2017) permettent de distinguer les patients MA des sujets contrôles. Cependant, une étude récente montre que L1CAM, utilisée pour isoler les VEs d'origine neuronale, n'est pas associée aux VEs présentes dans le LCS et le plasma (Norman et al., 2021). Il faut donc rester prudent sur les conclusions faites par la majorité des études citées qui l'utilise. D'autres études sont encore nécessaires pour comprendre la place et l'intérêt des VEs pour le diagnostic des tauopathies toutefois, ces quelques exemples supportent leur potentiel dans l'identification de biomarqueurs précoces.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Au fil des années, l'hypothèse de propagation de type prion de la pathologie tau est devenue omniprésente. De plus en plus de données appuient ce postulat mais beaucoup de questions restent encore en suspens ou débattues. Mieux comprendre les voies de propagation des espèces pro-nucléantes de tau est essentiel pour pouvoir développer des outils thérapeutiques permettant de les stopper. Face aux données accumulées sur le rôle des VEs dans la propagation des protéines mal conformées dans de nombreuses maladies neurodégénératives, ainsi que sur la présence de tau dans les VEs, nous avons émis l'hypothèse que les VEs pourraient transmettre la pathologie tau de neurone en neurone. De plus, cette voie de transfert pourrait, du moins en partie, expliquer la vulnérabilité cellulaire propre aux différentes tauopathies. En effet, de par leur contenu protéique et leurs différents récepteurs, les VEs pourraient cibler une population neuronale spécifique engendrant ainsi une vulnérabilité de certains neurones face à la pathologie et expliquant l'hétérogénéité de la progression de la pathologie tau dans les tauopathies.

Les objectifs de ce projet de thèse sont donc **(1)** d'évaluer la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs humaines issues de différents fluides biologiques et de différentes tauopathies et **(2)** d'étudier leur capacité à transmettre la pathologie tau *in vivo*. Il s'agira également **(3)** de chercher à isoler séparément différentes populations vésiculaires afin de comprendre leur rôle respectif dans le transport d'espèces pro-nucléantes et la propagation de la pathologie tau, et **(4)** de déterminer si les VEs peuvent être utilisées comme biomarqueurs précoces de la maladie d'Alzheimer.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I- MATÉRIELS

1. Modèles cellulaires *in vitro*

1.1. Lignées cellulaires HEK-293T

Les cellules HEK (*Human Embryonic Kidney*)-293T tau-RD-P301S-FRET (**figure 26**) (Holmes et al., 2014) et les cellules HEK-293T ont été cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco™) sans HEPES avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% de glutaMAX (Gibco™). Les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Les deux lignées cellulaires ont été passées deux fois par semaine.

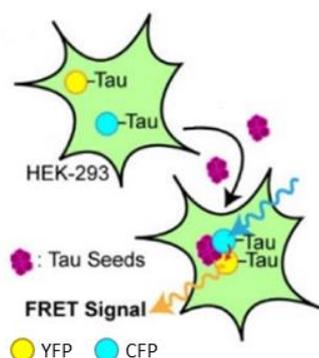


Figure 26 : Représentation schématique du modèle de nucléation tau HEK-FRET. Il a été développé à partir d'une lignée HEK-293T modifiée pour exprimer de façon stable les domaines de répétitions de tau (RD) mutés (P301S dans R2) couplés soit à une CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) soit à un YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). Ce modèle cellulaire permet d'étudier la nucléation de tau induite par la transfection d'espèces pro-nucléantes. Ces espèces recrutent la tau endogène pro-agrégative permettant ainsi un rapprochement dans l'espace (10-100 Å) de la CFP et de la YFP. L'excitation de la CFP entraîne une excitation de la YFP donnant un signal FRET (pour *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). D'après (DeVos et al., 2017).

1.2. Culture primaire de neurones corticaux

L'ensemble des expérimentations réalisées sur les animaux ont fait l'objet d'une autorisation du comité régional d'éthique (n°2015101320441671, 2016-2021). Les cultures primaires (CP) de neurones corticaux ont été réalisées à partir de fœtus de souris C57BL/6J à 15,5 jours de gestation. Brièvement, après avoir récupéré les cerveaux et retiré les méninges, le cortex a été disséqué dans du milieu de dissection Leitbovitz L15 (Life technologies) complémenté avec 30 mM de glucose. Les cortex ont ensuite été dissociés mécaniquement dans du milieu neurobasal (Life technologies) complémenté avec 2% de supplément B-27 50X (Life technologies), 0,5 mM de L-glutamine (Life technologies) et 1% d'antibiotique-antimycotique 100X (Life technologies). Une fois dissociées, les cellules ont été comptées sur une lame de comptage Kova en présence de bleu trypan (Sigma). Les cellules ont étéensemencées avec 160 000 cellules/cm² dans des plaques coatées au préalable avec 0,1 mg/mL de poly-D-Lysine (Sigma) et 20 µg/mL de laminine (Sigma) ou avec 0,5 mg/mL de poly-D-Lysine et 10 µg/mL de laminine pour les plaques avec des lamelles de verre et les labtek pour l'imagerie en vivant. Les cultures ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

2. Modèles transgéniques murins

Les souris mâles et femelles ont été élevées par groupe de 5 dans des cages ventilées dans une pièce à température contrôlée (20-22°C) avec un cycle jour/nuit de 12 h dans une animalerie exempte d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). La nourriture et l'eau sont disponibles *ad libitum*. Trois modèles de souris transgéniques différents ont été utilisés :

- Les souris **THY-tau30** expriment la protéine tau 1N4R humaine avec deux mutations pathogènes (P301S et G272V) sous le contrôle du promoteur Thy-1.2 spécifique aux neurones (K. Leroy et al., 2007). La pathologie apparaît de façon précoce et évolue rapidement. Les souris développent des DNF à partir de 3 mois dans l'hippocampe.
- Les souris **APP/PS1** expriment la protéine précurseuse de l'amyloïde (APP) mutée (K594M et N595L) et la protéine préséniline 1 (PS1) humaine sans la séquence codée par l'exon 9 sous le contrôle du promoteur de la protéine prion murine (Jankowsky et al., 2001, 2004). Elles développent des dépôts d'A β avant l'âge de 6 mois.
- Les souris **tau-KO** (*knock-out*) homozygotes n'expriment plus la protéine tau, ce qui permet d'étudier indirectement l'impact fonctionnel de tau (Dawson et al., 2001).
- Les souris **tau-KI** (*knock-in*)-**V5** expriment l'isoforme humaine 1N4R mutée (P301L dans R2) avec l'étiquette V5 (14 acides aminés situés juste après le premier insert : GKPIPNPLLGLDST) sous le contrôle d'un promoteur murin afin de permettre une expression physiologique du transgène. Ce modèle est en cours de caractérisation au laboratoire.

Les souris sauvages dites *wild-type* (WT) correspondent aux contrôles de portée des souris transgéniques. Il s'agit de souris sous fond génétique C57BL/6J, comme tous les modèles transgéniques utilisés. Les souris ont été réparties de façon aléatoire dans les groupes expérimentaux.

3. Échantillons humains

3.1. Tissu cérébral

Les extraits de cerveau humain de sujets contrôles non déments et de patients atteints de MA, de PSP ou de Pick ont été obtenus auprès de la Neurobanque de Lille (répondant aux critères de la loi française sur les ressources biologiques et déclarée à l'autorité compétente sous le numéro DC-2008-642) avec le consentement du donneur, la protection des données et l'examen du comité d'éthique. Les échantillons ont été gérés et stockés à -80°C par le centre de ressources biologiques de Lille (CRB) (CIC1403, BB-0033-00030). Les données démographiques et l'examen anatomopathologique sont présentés dans le [tableau 6 \(Annexe page 203\)](#).

3.2. LCS intraventriculaires, LCS lombaires et plasmas congelés

Les LCS intraventriculaires, les LCS lombaires et les plasmas de patients atteints ou non de MA ont été obtenus auprès de la Neurobanque de Lille et stockés à -80°C au CRB. Les données démographiques et cliniques sont présentées dans les [tableaux 7 à 11 \(Annexe pages 204 à 206\)](#). Les LCS intraventriculaires sont prélevés en post-mortem alors que les LCS lombaires et les plasmas sont prélevés du vivant des patients par ponction lombaire et par prise de sang, respectivement.

3.3. Cohorte ecTAUsome

La cohorte ecTAUsome a été constituée prospectivement pour une étude biomédicale pilote (*clinicaltrials.gov* NCT03381482, *principal investigator* V. Deramecourt, *Memory Center&UMRS1172, Lille -Scientific leader* M. Colin, *UMRS1172, Lille*) sur la nature des espèces de tau présentes dans le LCS et le plasma de différents sujets. Les sujets sont répartis dans 5

groupes différents selon plusieurs critères d'inclusion et d'exclusion (**tableaux 4 et 5, Annexe pages 201 à 202**). Chaque groupe doit être composé de 20 patients. Les inclusions actuelles sont représentées dans le **tableau 2**. Les patients ont été sélectionnés par des neurologues du Centre Mémoire de Ressources et de Recherche de Lille.

Tableau 2 : Nombre d'inclusions dans l'étude ecTAUsome depuis décembre 2017.

Groupe	1 - Contrôles	2 - Asymptomatique à haut risque	3 - Plaintes mnésiques	4 - Déficit cognitif léger (MCI)	5 - Diagnostic de MA probable
Nombre d'inclusions	6/20	7/20	7/20	20/20	20/20

Pour chaque patient, un prélèvement de sang et de LCS a été réalisé. Une partie est destinée aux examens cliniques et l'autre partie à la cohorte. Le LCS et le plasma ont été récupérés et traités immédiatement après le prélèvement afin d'éviter la dégradation de certaines VEs liées à la congélation. Ils ont été centrifugés 10 min à 2 000 g afin d'éliminer les cellules. La séparation des VEs et des protéines libres a été réalisée par chromatographie par exclusion de taille (*voir I-4.2.2*). Les fractions vésiculaires ont été analysées par suivi individuel de particules (NTA pour *Nanoparticles Tracking Analysis*) (*voir II-1.1*). La **figure 27** récapitule les différentes étapes du protocole et le matériel attribué à chaque analyse.

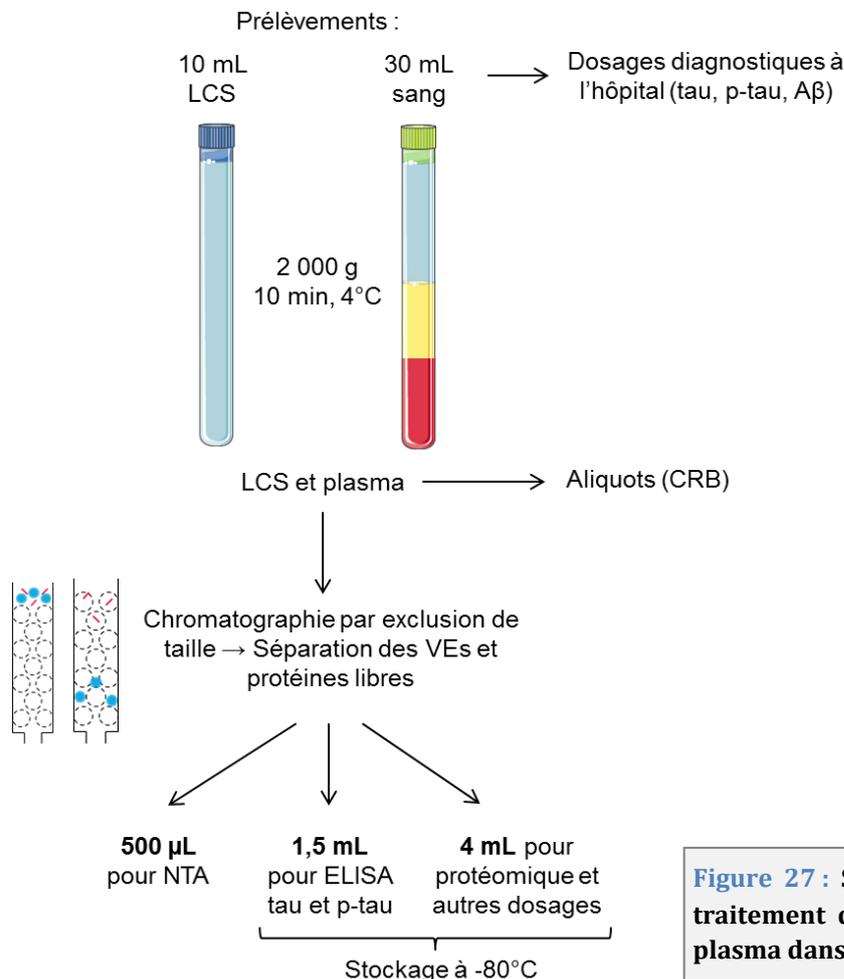


Figure 27 : Schéma expérimental pour le traitement des échantillons de LCS et de plasma dans la cohorte ecTAUsome.

4. Préparation des échantillons

4.1. Fluide cérébral

Afin d'isoler des VEs d'origine cérébrale, un fluide cérébral (FC) a été préparé comme décrit précédemment (Polanco et al., 2016). Pour les cerveaux humains congelés, le FC a été préparé à partir de trois régions différentes (cortex préfrontal (Brodmann Area (BA) 8/9), cortex occipital (BA 17) et cervelet (cortex et noyau dentelé)). 0,3 à 3 g de tissu cérébral ont été utilisés en fonction des prélèvements. Au moment de la préparation, une partie du tissu est conservée pour quantifier la pathologie tau dans la région adjacente à celle utilisée pour préparer le FC (voir II-1.11.1). Pour les FC de souris, le cerveau entier (sans les bulbes olfactifs et le cervelet) a été récupéré et congelé dans l'azote liquide après sacrifice.

Les tissus congelés ont été homogénéisés doucement dans un potter avec 5 mL d'Hibernate-A (Gibco™) sur glace. 2 mL d'Hibernate-A avec 20 unités/mL de papaine (LS003119, Worthington) ont été ajoutés à l'homogénat puis incubés pendant 20 min à 37°C sous agitation. La réaction enzymatique a été stoppée par ajout de 15 mL d'Hibernate-A froid avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (NaF 50 mM, Na₃VO₄ 200 nM, E-64 10 nM (Sigma), 1 tablette pour 50 mL de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche)) et la solution a été homogénéisée par 10 aspirations/refoulements. Des centrifugations successives ont été réalisées à 4°C (300 g, 10 min ; 2000 g, 10 min ; 10 000 g, 30 min) pour éliminer respectivement les cellules, les membranes et les débris. Le surnageant final a été aliquoté et conservé à -80°C avant l'isolement des VEs.

4.2. Isolement vésiculaire

4.2.1. Colonne de chromatographie par exclusion de taille

Nous avons sélectionné le système de chromatographie par exclusion de taille (SEC, de l'anglais *size exclusion chromatography*) comme méthode pour isoler les VEs des protéines libres sécrétées dans différents fluides (milieu de culture, fluide cérébral, LCS, plasma) (Böing et al., 2014). Des colonnes SEC maison contenant 10 mL de sépharose CL-2B (Sigma) ont été utilisées. Cette résine contient des billes d'agarose poreuses dont la taille des pores est décrite comme faisant environ 75 nm (Hagel et al., 1996). Les colonnes ont été stockées dans de l'éthanol 20% pour éviter le développement de micro-organismes dans la résine. Elles ont été équilibrées dans du tampon phosphate salin (PBS) avant toute purification vésiculaire. Après 5 purifications, elles ont été régénérées avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,5 M puis rééquilibrées dans du PBS. Toutes les solutions ont été dégazées dans un bain à sonication avant d'être passées dans les colonnes afin d'éviter la formation de bulles d'air dans la résine.

4.2.2. Protocole classique d'enrichissement des VEs

Pour l'enrichissement des VEs par SEC, 500 µL de liquides biologiques ont été chargés au niveau du filtre supérieur de la colonne de chromatographie. Une fois que l'échantillon est entré entièrement dans la colonne, 2 à 3 mL de PBS ont été ajoutés au-dessus de la colonne afin de permettre l'éluion de l'échantillon avec un débit de 36 à 48 s/mL. 1 à 2 mL de PBS ont été ajoutés au fur et à mesure. Les 3 premiers mL correspondent au volume vide et ont donc été éliminés. Les fractions suivantes de 1 à 20 (500 µL par fraction) ont été récupérées. Les fractions 1 à 4 (2 mL) contiennent les VEs, les fractions 5 à 8 (2 mL) contiennent des VEs et des protéines libres et les fractions 9 à 20 (6 mL) contiennent les protéines libres (figure 28).

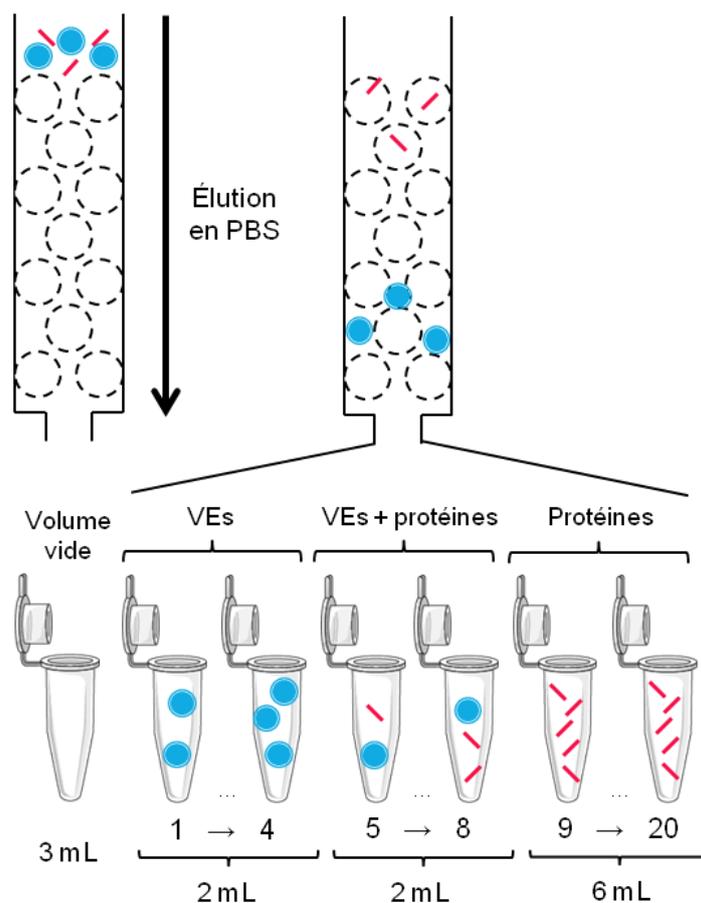


Figure 28 : Principe de la chromatographie par exclusion de taille. La résine contient des billes poreuses à travers lesquelles les VEs ne peuvent pas passer, contrairement aux protéines solubles. Elles sont donc éluées en premier dans les fractions 1 à 4 (fractions de 500 μ L).

4.2.3. Protocole optimisé pour séparer les grandes et les petites VEs

Afin d'optimiser la séparation par taille des VEs contenues dans les fractions 1 à 4 de milieu de CP et de fluide cérébral humain, une étape supplémentaire de centrifugation a été ajoutée après la SEC pour culoter les plus grandes vésicules (g-VEs). Une seconde étape d'ultracentrifugation a été ajoutée pour culoter les g-VEs restantes de façon à récupérer uniquement les petites vésicules (p-VEs) dans le surnageant. Les étapes d'ultracentrifugation ont été optimisées pour chaque fluide.

Pour les VEs issues de CP de neurones à DIV 20, le milieu a été concentré 30 fois sur Amicon® 30KDa puis 500 μ L ont été déposés sur SEC. La fraction 1 à 4 a été centrifugée à 15 000 g pendant 30 min à 4°C (Centrifuge 5424-R, Eppendorf). Le culot a été repris dans du PBS et à nouveau centrifugé à 15 000 g pendant 30 min. Le culot correspond alors aux g-VEs. Les surnageants ont été ultracentrifugés à 30 000 g pendant 2 h (Optima XE-90, rotor SW41Ti, Beckman) à 4°C pour culoter les g-VEs encore présentes et ainsi ne récupérer que les p-VEs dans le surnageant (figure 29).

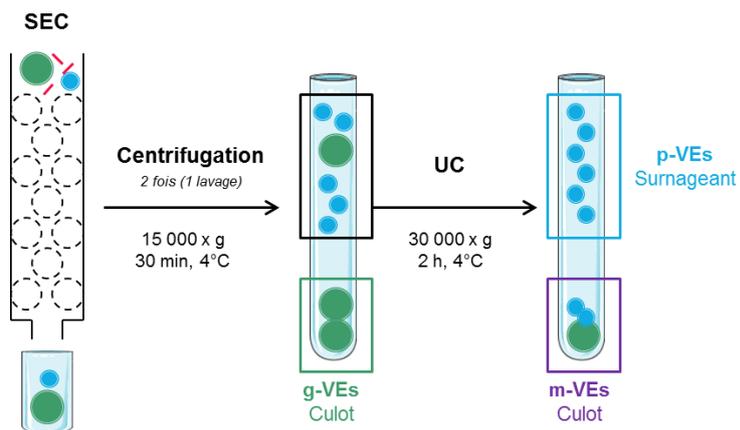


Figure 29 : Protocole optimisé pour la séparation des grandes et des petites VEs sécrétées par des CP de neurones de souris. Il combine une SEC suivie d'étapes d'ultracentrifugation (UC). Abréviations : g-VEs = grandes VEs, p-VEs = petites VEs, m-VEs = mix de grandes et de petites VEs.

Pour les VEs issues de FC, la fraction 1 à 4 a été centrifugée à 10 000 g pendant 30 min à 4°C (Centrifuge 5424-R, Eppendorf). Le culot a été repris dans du PBS et à nouveau centrifugé à 10 000 g pendant 30 min. Cette étape a été répétée une nouvelle fois. Le culot correspond alors aux g-VEs. Les surnageants ont été ultracentrifugés à 20 000 g pendant 2 h (Optima XE-90, rotor SW41Ti, Beckman) à 4°C pour culoter les g-VEs restantes et ainsi ne récupérer que les p-VEs dans le surnageant (figure 30).

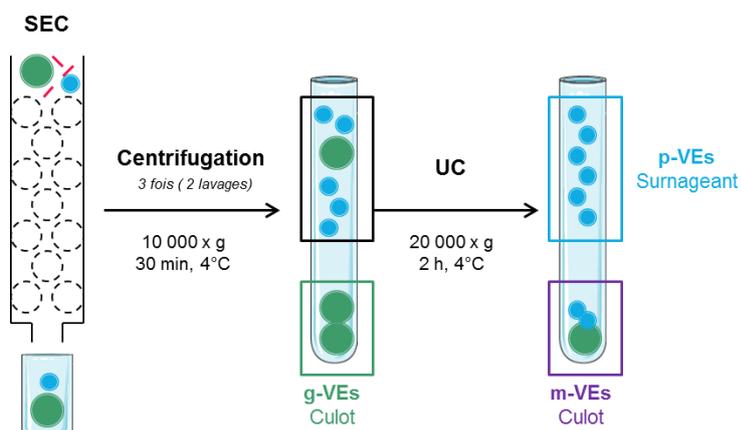


Figure 30 : Protocole optimisé pour la séparation des grandes et des petites VEs contenues dans le FC humain. Il combine une SEC suivie d'étapes d'ultracentrifugation (UC). Abréviations : g-VEs = grandes VEs, p-VEs = petites VEs, m-VEs = mix de grandes et de petites VEs.

4.3. Concentration vésiculaire

Pour certaines analyses, la fraction VEs 1-4 (2 mL) nécessite d'être concentrée dans un plus faible volume. Pour cela, des colonnes Amicon® ultra 3K (Merck Millipore) ont été utilisées. Après chargement de la fraction, ils ont été centrifugés à 4°C pendant la durée nécessaire pour obtenir le volume souhaité (entre 15 min et 2 h). Les amicons de 0,5 mL ont été centrifugés à 14 000 g (Centrifuge 5424R, Eppendorf) et ceux de 2 mL et de 15 mL ont été centrifugés à 4 000 g (Centrifuge Multifuge X3R, Thermo Scientific).

4.4. Infection lentivirale

Afin d'éteindre l'expression de tau dans les neurones, des CP de neurones ont été infectées à quatre jours de maturation (DIV 4 pour *days in vitro*) à l'aide d'un vecteur lentiviral ShTau. L'infection a été réalisée avec 100 ng (équivalent en protéines p24 de la capsid virale) de vecteur lentiviral pour 600 000 cellules en milieu minimum (500 µL de milieu conditionné par puits dans des plaques 12 puits) afin de favoriser l'interaction entre les cellules et les particules lentivirales. Après 6h, le milieu a été remplacé par du milieu conditionné sans vecteur lentiviral. Tous les vecteurs lentiviraux ont été produits au préalable dans le laboratoire de sécurité de niveau 3 (n° d'agrément OGM délivré par la Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation : 1285, 2015-2020). À DIV 24, le milieu de culture a été récupéré et purifié par SEC pour isoler les VEs. Les cellules ont été lysées dans 300 µL de tampon RIPA 2X (150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% déoxycholate de sodium, 0,1% SDS, 50 mM Tris HCl ; pH = 8,0) pour contrôler l'extinction de tau par western-blot.

4.5. Injections stéréotaxiques des VEs de fluide cérébral humain

Les VEs ont été isolées et concentrées dans un volume final de 150 µL comme décrit ci-dessus à partir d'un pool de 2 mL de FC de 4 sujets contrôles, 4 patients MA, 4 patients PSP et 4 patients Pick (**tableau 6, en gras, Annexe page 203**). 2 µL (6×10^9 VEs) ont été injectés bilatéralement dans l'hippocampe de souris THY-tau30 ou WT âgées de 1 mois (n = 5 par groupe) et anesthésiées (kétamine 100 mg/kg + xylazine 20 mg/kg). L'injection a été réalisée aux coordonnées décrites précédemment : antéro-postérieur : -2,5 mm; médial-latéral : +/- 1 mm; dorso-ventral : -1,8 mm du bregma) (Albert et al., 2019). La procédure d'injection standard consistait à administrer les VEs à l'aide d'une seringue en verre Hamilton de 10 µL avec une aiguille fixe. Après injection à un débit de 0,25 µL par min, l'aiguille a été laissée en place pendant 5 min avant son retrait pour éviter toute fuite du matériel injecté. 1 mois post-injection, les souris ont été anesthésiées et perfusées par voie intracardiaque avec une solution saline à 0,9% à 4°C puis avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 10 min. Les cerveaux ont été immédiatement prélevés et fixés dans du PFA 4% pendant une nuit puis rincés dans du PBS et placés dans une solution de sucrose à 20% pendant 24 h avant cryopréservation à -80°C. Des coupes coronales flottantes de 40 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM3050 S).

II- MÉTHODES

1. Analyses des échantillons

1.1. Analyse du suivi individuel des particules (NTA)

Les fractions vésiculaires ont été analysées avec le NanoSight NS300 (Malvern Panalytical). Cet analyseur de suivi des particules permet de suivre individuellement des particules de 10 à 2000 nm. Il exploite la diffusion de lumière et le mouvement brownien des particules en suspension dans un liquide pour déterminer leur taille et leur concentration (**figure 31**). Les fractions ont été diluées dans du PBS avant d'être injectées avec une pompe à débit automatique. Le niveau de la caméra a été fixé à 14 ou 15 selon l'origine du fluide afin de pouvoir différencier les petites vésicules des plus grosses, et le seuil de détection a été fixé à 4 afin de limiter le bruit de fond. Pour générer des données statistiques, entre 3 et 5 vidéos de 60 à 90 secondes ont été enregistrées et analysées à l'aide du logiciel NTA 3.2. Pour la cohorte ecTAUsome, 7 vidéos de 90 secondes ont été enregistrées.

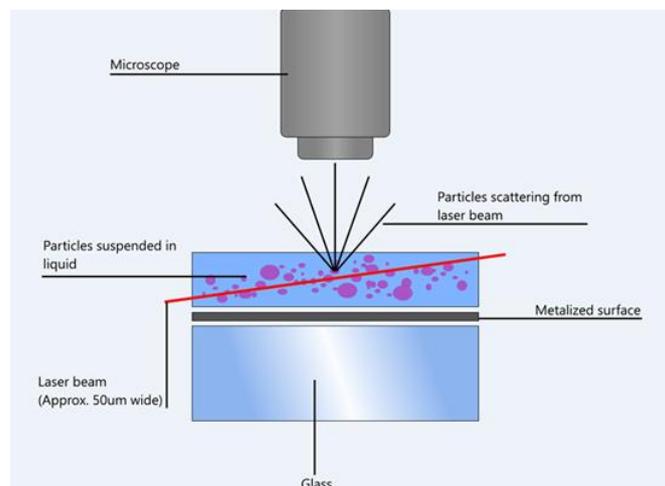


Figure 31 : Principe de fonctionnement du NanoSight NS300. Un faisceau laser traverse la chambre d'analyse où se trouvent les particules en suspension. La présence de particules sur la trajectoire de ce faisceau provoque une diffusion de la lumière. Cette diffusion est ensuite visualisée et enregistrée par un microscope (20x) couplé à une caméra. Source : www.atascientific.com

1.2. Dosages protéiques

La concentration protéique des échantillons a été déterminée avant la réalisation des Western-blot à l'aide d'un dosage BCA (pour *BiCinchoninic acid Assay*) selon le protocole du fabricant (Pierce™ BCA Protein Assay kit, ThermoScientific). Après incubation des réactifs et de l'échantillon 30 min à 37°C, l'absorbance a été lue à 570 nm (Multiskan FC, ThermoScientific).

La concentration protéique dans les fractions purifiées par SEC a été déterminée à l'aide du NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Ce spectrophotomètre permet d'évaluer à partir de micro-volumes la concentration des protéines contenant des acides aminés tyrosines et tryptophanes. L'absorbance de chaque échantillon a été lue à 280 nm.

1.3. Western-blot et gel d'argent

Les échantillons (10 µg) ont été dilués au ½ dans un tampon de lithium dodécyl sulfate (LDS) 2X et d'agents réducteurs 10X (dithiothréitol, NuPAGE®) pour dénaturer les protéines, les charger négativement et casser les ponts disulfures. Ils ont ensuite été chauffés à 100°C pendant 10 min puis chargés sur un gel 4-12% Bis-Tris NuPAGE® Novex® (Invitrogen). La migration a été réalisée dans un tampon de migration (MOPS SDS Running Buffer (20X), NuPage®) pendant 1 h à 200V.

Pour le western-blot, les protéines présentes sur le gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Hybond, GE Amersham®). Afin de vérifier l'efficacité du transfert, une coloration réversible au rouge ponceau (Ponceau 2R 0,2%, acide trichloroacétique 3%) a été effectuée. La membrane a ensuite été incubée 1h à température ambiante (TA) avec une solution de blocage (lait 5% ou BSA 5% dans TNT (Tris 15 mM pH8, NaCl 140 mM, Tween 0,05 %)) puis avec l'anticorps primaire (**tableau 3**) une nuit à 4°C sous agitation. Après rinçage, la membrane a été incubée pendant 1 h à TA avec l'anticorps secondaire approprié couplé à une HRP (*horseradish peroxidase*) (**tableau 3**). Le signal a été visualisé à l'aide d'un kit de chimioluminescence (ECL™, Amersham™, GE Healthcare) avec l'appareil Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Les résultats ont été normalisés au signal de la GAPDH (*glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase*) et la quantification a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés en western-blot.

Anticorps anti-	Référence	Dilution
HSP90 α/β (F-8)	Santacruz, sc-13119	1/100 ^e
GAPDH	Santacruz, sc47724	1/10 000 ^e
Tau C-ter	Produit au laboratoire	1/10 000 ^e
IgG souris (2 nd)	Vector Laboratories, PI-2000	1/50 000 ^e
IgG lapin (2 nd)	Vector Laboratories, PI-1000	1/5 000 ^e

Pour la coloration à l'argent, le gel a été fixé pendant une nuit dans 40% d'éthanol et 10% d'acide acétique. Les protéines ont été révélées à l'aide du kit de coloration au nitrate d'argent PlusOne (GE Healthcare) selon le protocole du fabricant.

1.4. Dosage immuno-enzymatique (ELISA)

Avant de réaliser les ELISA, les échantillons (VÉs ou lysats de CP) ont été lysés avec un tampon RIPA, ou un tampon Laemmli 2X (20mM Tris-Cl, 20% glycérol, 4% SDS ; pH 6,8) pour les ELISA Aβ. Les lysats cellulaires et les fractions vésiculaires ont été soniqués à 200 W pendant 5 minutes à intervalle de temps de 30 secondes (Bioruptor® Sonication System, Diagenode).

1.4.1. INNOTEST hTau

La concentration en protéine tau humaine a été déterminée grâce à un ELISA INNOTEST® hTau (Fujirebio) selon le protocole du fabricant. Brièvement, 25µL d'échantillon par puits coaté avec l'anticorps AT120 (épitope : ²¹⁸-PPTREPK-²²⁴) ont été incubés sous agitation à TA pendant une nuit en présence des anticorps monoclonaux HT7 (épitope : ¹⁵⁹-PPGQK-¹⁶³) et BT2 (épitope : ¹⁹³-DRSGYS-¹⁹⁸) couplés à de la biotine. Les puits ont été rincés avec la solution de

lavage du kit puis incubés à TA pendant 30 min avec la solution de streptavidine couplée à la peroxydase. Les puits ont de nouveau été rincés puis incubés 30 min avec le substrat (TMB : substrat chromogène réagissant avec la peroxydase). La solution stop du kit contenant de l'acide sulfurique a été ajoutée pour stopper la réaction TMB/ peroxydase. L'absorbance est lue à 450 nm (Multiskan FC, ThermoScientific). Une gamme étalon de 2500 pg/mL à 40 pg/mL a été utilisée pour déterminer la concentration en protéines tau humaine dans les échantillons.

1.4.2. ELISA V5

Pour les expériences d'internalisation neuronale de tau via les VEs, la concentration en protéine tau dans les neurones a été déterminée grâce à un ELISA sandwich développé au laboratoire ciblant l'étiquette V5 de la protéine tau. Des puits ont été pré-traités avec un anticorps anti-V5 (46-0705, Invitrogen) dilué au 1/1000^e dans du tampon carbonate (NaHCO₃ 0,1M ; Na₂CO₃ 0,1M ; pH=9,6) sous agitation une nuit à 4°C. Les puits ont été saturés avec de la caséine 0,1 % pendant 1 heure à 37°C puis rincés avec la solution de lavage du kit INNOTEST® hTau dont les réactifs seront utilisés par la suite. Après dépôt de 25 µL d'échantillon par puits, le protocole est le même que pour l'INNOTEST hTau. L'absorbance est lue à 450 nm (Multiskan FC, ThermoScientific). Une gamme étalon de 1000 pg/mL à 62,5 pg/mL de protéines tau 1N4R-V5 recombinantes (produite dans le laboratoire « Biologie structurale intégrative », UMR1167, Lille) a été utilisée pour déterminer la concentration en protéine tau dans les échantillons analysés.

1.4.3. ELISA Aβ40 et Aβ42

La concentration en peptides Aβ40 et Aβ42 humains dans les VEs de FC humains a été déterminée à l'aide du kit ELISA Aβ40 humain (KHB3481, Invitrogen) et ELISA Aβ42 humain (KHB3441, Invitrogen) selon le protocole du fabricant. L'absorbance est lue à 450 nm (Multiskan FC, ThermoScientific). Pour le kit Aβ40, une gamme étalon de 500 pg/mL à 7,81 pg/mL a été utilisée. Pour le kit Aβ42, une gamme étalon de 1000 pg/mL à 15,63 pg/mL a été utilisée.

1.4.4. Simoa®

Pour les échantillons de la cohorte ecTAUsome, le dosage de la protéine tau nécessite une technique plus sensible que l'ELISA INNOTEST hTau. Les premières mises au point ont été réalisées par l'équipe de la Plateforme de Protéomique Clinique basée à Montpellier à l'aide du kit *Neurology 4-Plex A* (Quanterix) et de l'analyseur Simoa HD-1 (Quanterix) selon le protocole du fabricant. Cette technologie est basée sur l'isolement individuel de billes paramagnétiques couplées à des anticorps ciblant la protéine d'intérêt. Elle permet ainsi d'enregistrer le signal propre à chaque complexe même si une seule protéine s'est fixée aux anticorps. La limite de quantification pour la protéine tau est de 0,053 pg/mL.

1.5. Immunodéplétion

L'immunodéplétion de la protéine tau dans les VEs cérébrales des souris THY-tau30 âgées de 6 mois a été réalisée en utilisant les billes magnétiques Magna CHIP protéines A+G (Sigma Aldrich). Les VEs ont été soniquées à 200 W pendant 30 min à intervalle de temps de 30 secondes (Bioruptor® Sonication System, Diagenode) (**figure 32**), puis incubées avec 2 µg d'anticorps anti-tau (HT7, MN1000, Thermo Scientific) ou avec 2 µg d'anticorps IgG1 monoclonal (GST (B-14), Santa Cruz) pendant une nuit à 4°C sous agitation. 20 µL de billes ont été ajoutés au complexe anticorps-antigène pendant 2 h à 4°C sous agitation. Le complexe bille-

anticorps-antigène a été isolé en utilisant un support magnétique et le surnageant a été collecté puis analysé par ELISA hTau et dans le modèle FRET.

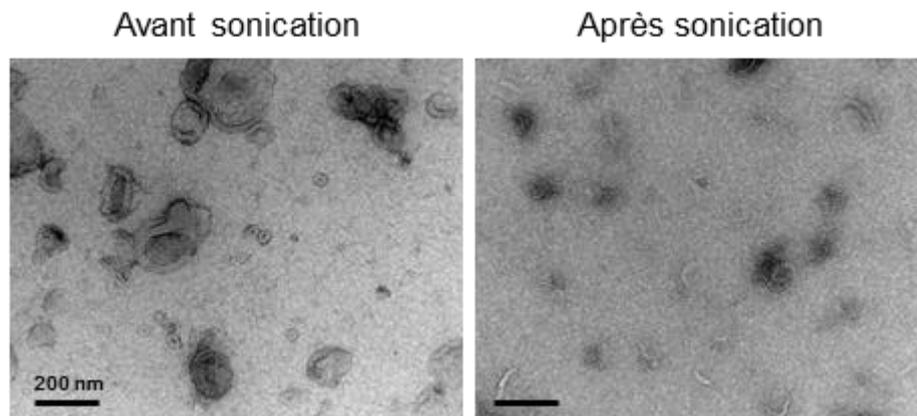


Figure 32 : Photos de microscopie électronique de VEs avant et après 30 min dans un bain à sonication. L'échelle est identique sur les deux photos.

1.6. Traitement à la protéinase K

Afin de déterminer si la protéine tau est présente à l'intérieur des VEs, des VEs de FC de souris THY-tau30 âgées de 6 mois ont été lysées dans du tampon RIPA (pour l'ELISA hTau), soniquées 30 min (pour le test FRET) ou conservées intactes après isolement par SEC. Elles ont ensuite été mises en présence de 10 µg/mL de protéinase K pendant 30 min à 37°C. La réaction a été stoppée avec 5 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) pendant 10 min à TA.

1.7. FRET et cytométrie en flux

Pour le test de nucléation de la protéine tau par FRET, les cellules HEK-293T-FRET et HEK-293T ont étéensemencées dans des plaques 12 puits avec 150 000 cellules par puits dans 1 mL de milieu 24 h avant le traitement. Le lendemain, 100 µL d'échantillon ont été incubés avec 100 µL d'opti-MEM contenant 1/10^e de lipofectamine 2000 (Invitrogen) pendant 20 min à TA. 2 µM de fibres recombinantes K18 (4 domaines de répétition de tau) soniquées ont été utilisés comme contrôle positif et du PBS a été utilisé comme contrôle négatif. Après 20 min, les échantillons ont été ajoutés dans le milieu des cellules. 72h plus tard, les cellules ont été décollées avec du PBS à 37°C. Les cellules ont été incubées pendant 30 min à TA avec un marqueur de viabilité (Zombie NIR™, Biolegend) dilué au 1/200^e. Après un rinçage dans du PBS, les cellules ont été fixées dans du PFA 2% 10 min à TA. Elles ont été rincées une nouvelle fois dans du PBS puis suspendues dans 300 µL de PBS pour les analyses en cytométrie en flux à l'aide de l'appareil Aria SORP BD Biosciences (logiciel d'acquisition FACS DIVA V7.0, BD Biosciences). Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation suivantes ont été utilisées et enregistrées pour le FRET : excitation CFP 405 nm et émission 466 ± 40 nm, excitation YFP 488 nm et émission 529 ± 30 nm, FRET YFP 529 ± 30 nm. Les données ont été quantifiées à l'aide du logiciel KALUZA Analyze v2. Les résultats ont été exprimés en % de signal FRET multiplié par l'intensité de fluorescence médiane (MFI). Pour les échantillons issus de cerveau humain, cette valeur a été normalisée au poids de tissu utilisé pour préparer le FC (% FRET x MFI/g de tissu).

1.8. Microscopie électronique

Les échantillons (5 μ L) ont été déposés sur des grilles carbonées (CF400-NI) et incubés pendant 20 min à TA. Pour le marquage immunologique à l'or, une fixation dans du PFA 2% a été réalisée pendant 20 min. Les grilles ont été rincées 2 à 3 min dans du PBS-glycine 50 mM à TA. Une saturation en PBS-BSA 1% - sérum de chèvre 1% a été réalisée 1h à TA avant incubation avec l'anticorps anti-CD63 (H5C6, Novasbio) dilué au 1/50^e dans du PBS-BSA 1% - sérum de chèvre 1%. Les grilles ont ensuite été rincées dans du PBS-BSA 0,1% avant incubation avec l'anticorps secondaire anti-souris (or colloïdal, 12 nm) dilué au 1/20^e pendant 1 h à TA. Enfin, elles ont été rincées dans du PBS. Pour la suite du marquage ainsi que pour les analyses morphologiques, les grilles ont été rincées à l'eau distillée après fixation 5 min à TA dans du PBS-glutaraldéhyde 1%. Elles ont été incubées 5 min dans 1% d'acétate d'uranyle puis 10 min sur glace dans 1% d'acétate d'uranyle et 2% de méthylcellulose. Une fois sèches, les grilles ont été observées au microscope électronique à transmission (Zeiss EM900).

Pour l'optimisation de la séparation des grandes et des petites VEs, entre 200 et 1500 VEs ont été quantifiées (moyenne \pm écart-type : 975 \pm 328 VEs pour le FC et 557 \pm 348 VEs pour la CP) pour chaque fraction. Le diamètre de chaque VEs a été déterminé en fonction de l'échelle sur ImageJ.

1.9. Internalisation neuronale de tau via les VEs

Afin de visualiser le transfert de tau via les VEs, 16x10⁹ VEs de FC de souris Ki-V5 contenues dans 20 μ L de PBS ont été ajoutées dans le milieu (300 μ L) de 300 000 cellules à DIV 25, au moment où les neurones sont matures et présentent une synchronisation de leur activité électrique. Après 6 h, le milieu a été retiré et les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS à 37°C avant d'être lysées avec 60 μ L de tampon RIPA 1X pour l'analyse en ELISA V5 ou fixées à la PFA 4% pendant 10 min à TA pour l'immunofluorescence anti-V5.

Pour visualiser l'internalisation de ces mêmes VEs en temps réel dans les neurones, elles ont été préalablement marquées avec un colorant lipophile fluorescent rouge (PKH26, Sigma) selon le protocole du fabricant. Brièvement, 2 nM final de PKH26 ont été mixés avec 6x10¹⁰ VEs dans 500 μ L final (PBS + diluant C du kit), et incubés pendant 5 min à TA. Du PBS sans VEs a été utilisé comme contrôle négatif. La réaction d'incorporation du PKH26 aux membranes vésiculaires a été stoppée en ajoutant 500 μ L de PBS-BSA 3%. Une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 50 min (Optima TL, rotor TLA 110, Beckman) a été réalisée pour éliminer le colorant non incorporé et culoter les VEs marquées. Le culot a été repris dans 500 μ L PBS. Cette étape a été répétée deux autres fois. Le culot final a été repris dans 100 μ L de PBS afin de pouvoir transférer un faible volume sur les CP de neurones. La veille du début des acquisitions, les CP ont été marquées avec du WGA Alexa Fluor™ 647 (Wheat Germ Agglutinin, Invitrogen) dilué au 1/200^e dans du Leibovitz's (Gibco) pendant 10 min à 37°C puis rincées 3 fois au PBS chaud avant de remettre le milieu conditionné. Juste avant les premières acquisitions, 2x10⁹ VEs marquées et contenues dans 20 μ L de PBS ont été déposées dans le milieu de 160 000 cellulesensemencées dans une chambre labtek (Ibidi®) avec un fond en verre.

1.10. Immunofluorescence et microscopie confocale

Les cellules fixées ont été perméabilisées dans du PBS-BSA 1%-Triton 0,1% pendant 15 min à TA. Une saturation des sites de fixation aspécifiques a été réalisée à l'aide de PBS-BSA 1% pendant 1 h à TA. Les cellules ont été mises en présence d'une solution d'H₂O₂ à 0,3% pendant 30 min à TA avant d'être incubées avec l'anticorps primaire anti-V5 (46-0705, Invitrogen) dilué au 1/10 000^e dans du PBS-BSA 1%-Triton 0,1% pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG2a de souris conjugué à une HRP (M32207, Invitrogen) dilué au 1/500^e dans du PBS pendant 1 h à TA. Elles ont ensuite été incubées avec le réactif du kit d'amplification TSA (Tyramide Signal Amplification, Akoya Biosciences) 488 nm dilué au 1/20^e dans le diluant du kit pendant 10 min à TA avant l'ajout de DAPI (Dilactate D3571, Invitrogen) dilué au 1/5000^e dans du PBS pendant 10 min à TA. Des rinçages avec du PBS ont lieu entre chaque étape. Enfin, les lamelles ont été montées avec du Fluoromount-G (Invitrogen) sur des lames de verres puis scellées avec du vernis à ongles et stockées à 4°C avant l'observation. Les images ont été acquises en utilisant un microscope confocal LSM710 (Zeiss).

Pour l'étude d'internalisation des VEs en temps réel, des acquisitions toutes les 10 min ont été réalisées dans 10 champs différents immédiatement après l'ajout des VEs et pendant 6 h. Ensuite, des acquisitions sur 20 champs différents ont été réalisées après 24h et 48h avec le microscope confocal AxioObserver Z1 (Zeiss) associé à une tête spinning disk Yokogawa CSU-X1. Lors des acquisitions, les cellules sont restées incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Les images ont été acquises avec le logiciel ZEN 2.3 et analysées avec le logiciel ImageJ.

1.11. Immunohistochimie sur coupes flottantes

1.11.1. Coupes humaines

Afin de quantifier la lésion tau dans les régions ayant servi à préparer le FC, une immunohistochimie (IHC) automatisée a été réalisée sur coupes fixées incluses en paraffine de 4 µm d'épaisseur sur Benchmark Ultra (Roche Tissus Diagnostics®), en utilisant le kit de détection UltraView DAB IHC (Ventana®) et l'anticorps primaire AT8 dilué au 1/500^e. L'anticorps monoclonal AT8 (MN1020; Thermo Scientific) reconnaît la protéine tau phosphorylée sur les sérines 202 et 208 et sur la thréonine 205 (Malia et al., 2016). Les coupes de cerveau humain ont été quantifiées à l'aveugle en utilisant le logiciel QuPath-0.2.1. Des seuils ont été établis grâce à un algorithme dédié à l'intelligence artificielle (Artificial neuronal network, ANN_MLP) utilisant des objets identifiés sur un jeu de lames. Ces seuils sont restés constants tout au long de l'analyse. Les résultats sont exprimés en pourcentage de lésions tau ((pixels positifs pour AT8 / pixels totaux) x100).

1.11.2. Coupes murines

Les coupes ont été lavées dans du PBS-Triton 0,2%, traitées pendant 30 min à TA avec de l'H₂O₂ à 0,3% et lavées 3 fois. La liaison non spécifique a été bloquée en utilisant le réactif *Mouse on Mouse* (MKB-2213, Vector Laboratories) dilué au 1/100^e dans du PBS pendant 60 min à TA. Après 3 rinçages dans du PBS-Triton 0,2%, les coupes ont été incubées avec l'anticorps MC1 dilué au 1/1000^e ou avec l'anticorps AT100 dilué au 1/500^e dans du PBS-Triton 0,2% pendant une nuit à 4°C. L'anticorps monoclonal MC1 (donné par le Dr Peter Davis) reconnaît un changement conformationnel de la protéine tau. Sa réactivité dépend à la fois de l'extrémité N-terminale (acides aminés 7-9) et d'une séquence d'acides aminés dans le troisième domaine de

liaison des microtubules (acides aminés 313–322) (Allen et al., 2002; Jeganathan et al., 2008; Jicha et al., 1997). L'anticorps monoclonal AT100 (MN1060; Thermo Scientific) reconnaît la thréonine 212 et la sérine 214 phosphorylées uniquement dans les formes insolubles ou agrégées de tau (Anderson et al., 2008; Hoffmann et al., 1997; Yoshida & Goedert, 2006; Zheng-Fischhöfer et al., 1998). Après 3 rinçages dans du PBS-Triton 0,2%, le marquage a été amplifié par incubation avec une IgG biotinylée anti-souris diluée au 1/400^e dans du PBS-Triton 0,2% pendant 60 min à TA. Puis, les coupes ont été incubées avec le complexe avidine-biotine-HRP (kit ABC, Vector) dilué au 1/400^e dans du PBS pendant 2h avant l'ajout de tétrahydrochlorure de diaminobenzidine (Vector) dans du Tris-HCl 0,2 mol/L, pH 7,6, contenant 0,0015% de H₂O₂ pour la visualisation. Les coupes ont ensuite été montées, séchées à l'air, déshydratées par passage à travers une série graduée de bains d'alcool (30%, 70%, 95%, 100%) et de toluène, et enfin montées avec du Vectamount (Vector Laboratories) sur lame. Elles ont été scannées à l'Axioscan Z1 (Zeiss). La quantification a été faite en aveugle sur 5 coupes par hippocampe couvrant les bregmas de -2,3 à -2,8 au niveau de la région CA1. Chaque corps cellulaire marqué a été comptabilisé. Les résultats représentent la somme des corps cellulaires marqués dans la CA1 divisée par le nombre de bregmas analysés, soit le nombre moyen de corps cellulaires marqués par coupe.

1.12. Spectrométrie de masse

Les analyses protéomiques ont été réalisées en collaboration avec l'équipe PRISM (U1192) à Lille. Suite à l'optimisation du protocole de séparation vésiculaire (*voir I-4.2.3*), 5x10¹⁰ VEs ont été lysées dans un tampon RIPA pendant 15 min à 95°C. La préparation des échantillons par FASP (pour *filter aided sample preparation*) a été réalisée à l'aide de colonnes Amicon® (Millipore) de 30KDa pour permettre l'élimination du tampon de lyse. Les échantillons ont ensuite été incubés avec de la trypsine à 37°C pendant une nuit. Les protéines digérées ont été collectées par centrifugation et les colonnes Amicon® ont été rincées au NaCl 0,5 M. La digestion a été arrêtée en utilisant de l'acide trifluoroacétique (TFA) 5%. Les peptides ont été dessalés à l'aide d'un ZipTip C18 (Millipore) puis séchés sous aspiration et reconstitués dans de l'acide formique/acétonitrile 0,1% (98:2, volume/volume) avant analyse par spectromètre de masse NanoLC-MS/MS. L'analyse a été réalisée sur un spectromètre de masse Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific). L'interrogation sur banque de données (Uniprot, Human 77 027 séquences, ou *Mus musculus* 55 470 séquences, 2021) a été réalisée avec le logiciel MaxQuant (version 1.6.0.5), et les analyses comparatives et statistiques ont été faites avec le logiciel Perseus (version 1.6.10.43). Les analyses d'enrichissement pour les catégories « processus biologiques » et « composants cellulaires » ont été obtenus avec le logiciel Funrich (version 3.1.4).

2. Analyses statistiques

Les statistiques et les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8. Les données représentent les moyennes ± écarts-types. En fonction du nombre d'expériences, du nombre d'individus par groupe et du nombre de groupes comparés, différents tests statistiques ont été effectués. Pour les analyses de corrélation, un coefficient de corrélation de Spearman a été calculé pour les groupes d'au moins 8 individus. La normalité des distributions a été évaluée graphiquement et en utilisant le test de Shapiro-Wilk pour les groupes d'au moins 10 individus. Si la distribution suit une loi normale, un test T de Student a été réalisé pour les comparaisons

entre deux groupes et une ANOVA a été réalisée pour les comparaisons entre plus de deux groupes. L'ANOVA a été suivie d'un test de Sidak pour les comparaisons multiples *a posteriori* deux à deux. Si la distribution ne suit pas une loi normale ou que le nombre d'individus est inférieur à 8, un test de Mann-Whitney a été réalisé pour les comparaisons entre deux groupes. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour les comparaisons entre plus de deux groupes. Il a été suivi d'un test de Dunn pour les comparaisons multiples *a posteriori* deux à deux. Les tests statistiques ont été effectués avec un risque α de 0,05. Si la probabilité (p) qu'il existe une différence entre les groupes est inférieure au risque α alors cette différence sera acceptée.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

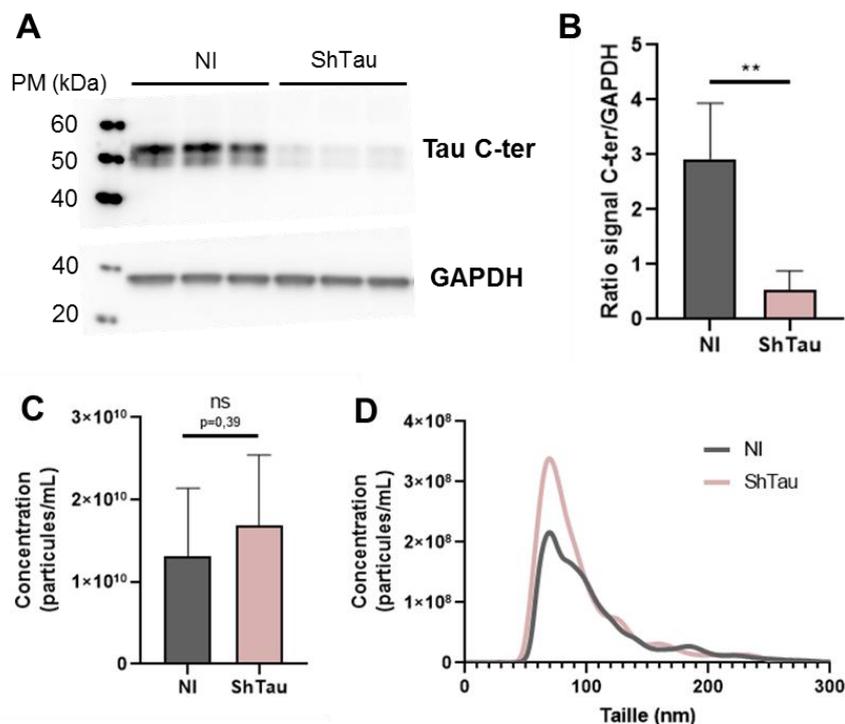
I- Implication des VEs dans la propagation de la pathologie tau

La première partie de ce travail se consacre à répondre aux trois premiers objectifs établis précédemment. Son but est de mieux comprendre la place des VEs dans la propagation de la pathologie tau. Pour cela, nous avons travaillé à partir de VEs issues de fluides cérébraux (FC) humains et murins ou de VEs sécrétées par des neurones primaires en culture. Brièvement, nous nous intéresserons à l'influence de la protéine tau sur la sécrétion vésiculaire globale avant de nous étendre sur l'implication des VEs dans le transport d'espèces pro-nucléantes de tau capables de transmettre la pathologie *in vivo*. Les aspects mécanistiques du transfert intercellulaire de la protéine tau médiée par les VEs seront également abordés ainsi que l'identification des sous-populations vésiculaires impliquées dans le transfert d'espèces pro-nucléantes de tau.

1. La protéine tau ne module pas la sécrétion vésiculaire globale

La protéine tau est une protéine pléiotropique pour laquelle de nouvelles fonctions sont découvertes et encore à découvrir. Étant donné que la protéine tau peut être associée à la membrane plasmique (Arrasate et al., 2000; Brandt et al., 1995), nous nous sommes interrogés sur sa potentielle implication dans les mécanismes de biogénèse et de sécrétion vésiculaire.

Pour cela, des cultures primaires (CP) de neurones corticaux exprimant la protéine tau murine sauvage ont été infectées avec un vecteur lentiviral permettant d'éteindre l'expression de cette protéine (ShTau). Une analyse biochimique de la protéine tau dans les lysats neuronaux a permis de confirmer l'extinction de son expression suite à l'infection (figure 33, A et B). Le milieu conditionné des neurones infectés et non infectés a été purifié par chromatographie par exclusion de taille (SEC) afin d'en isoler les VEs. Leur concentration a été évaluée par analyse du suivi individuel des particules (NTA) (figure 33, C et D). La concentration totale ainsi que la distribution par taille des VEs neuronales libérées dans le milieu ne sont pas modifiées suite à l'extinction de l'expression de la protéine tau *in vitro*.



(figure page précédente)

Figure 33 : L'extinction de l'expression de la protéine tau ne modifie pas la sécrétion vésiculaire neuronale globale. (A) Western-blot dirigé contre la partie C-terminale de la protéine tau et la GAPDH dans les lysats de neurones primaires de souris (10 µg) 20 jours post-infection avec 100 ng (équivalent en protéines de capsid virale, p24) de vecteur lentiviral ShTau. (B) Quantification de l'extinction de la protéine tau dans les lysats neuronaux. (C) Concentration vésiculaire dans le milieu conditionné des cultures après isolement des VEs par SEC. (D) Concentration vésiculaire en fonction de la taille. NI = Non infecté. PM = Poids moléculaires. N=2 cultures indépendantes avec un triplicat technique. Test de Mann Whitney : **p<0,01 ; p>0,05, ns : non significatif.

Afin de valider ces données dans un modèle plus intégré, du fluide cérébral a été préparé à partir de cerveaux de souris sauvages (WT) et KO-tau homozygotes (Dawson et al., 2001), n'exprimant plus la protéine tau, âgées de 1, 3 ou 6 mois. Les VEs cérébrales ont ensuite été isolées par SEC et leur concentration a été évaluée par NTA (figure 34, A). Il n'existe aucune différence significative entre les souris WT et KO-tau quel que soit leur âge. Cependant, la concentration des VEs dans le cerveau des souris augmente significativement avec l'âge, entre 1 et 6 mois. Il existe également une tendance entre 1 et 3 mois. Nous pouvons également remarquer que la concentration vésiculaire est de plus en plus hétérogène entre les souris avec l'avancée en âge. Le pourcentage de VEs dont la taille est inférieure ou supérieure à 150 nm a également été moyenné pour chaque groupe de souris (figure 34, B). Environ la moitié des VEs fait plus de 150 nm, quel que soit le groupe. Par conséquent, ni l'expression de la protéine tau, ni l'âge, ne semblent avoir d'influence sur la taille des VEs sécrétées. L'absence d'expression de la protéine tau ne modifie donc pas la sécrétion vésiculaire globale dans le cerveau murin, ce qui va dans le même sens que les observations faites précédemment *in vitro* dans des cultures primaires neuronales.

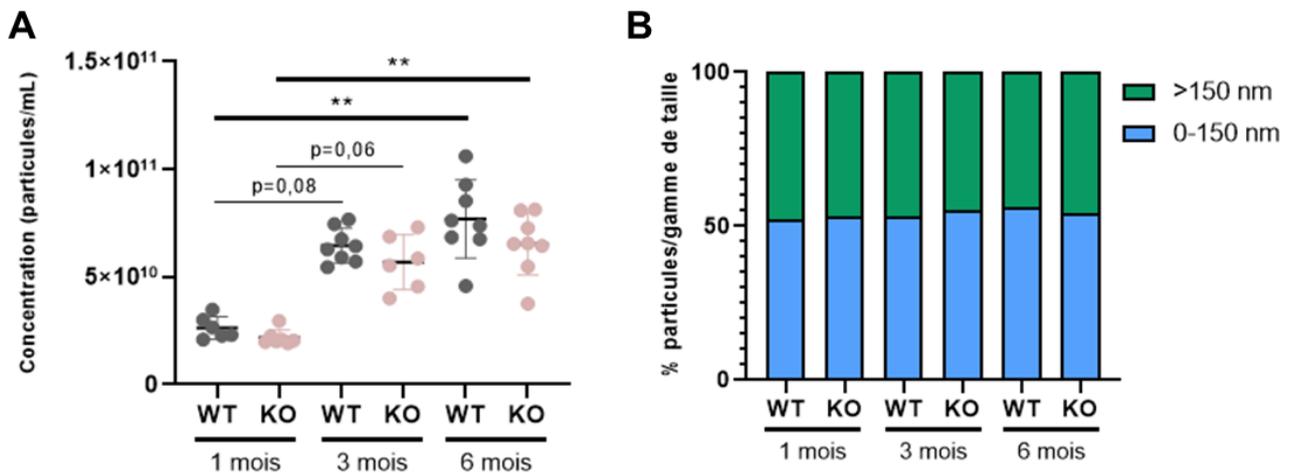


Figure 34 : L'absence d'expression de la protéine tau ne modifie pas la sécrétion vésiculaire globale dans le cerveau murin. Du fluide cérébral (FC) a été préparé à partir de cerveaux de souris WT ou KO tau de 1, 3 ou 6 mois. 500 µL de FC ont été purifiés par SEC afin d'isoler les VEs. (A) Concentration vésiculaire individuelle déterminée par NTA. (B) Répartition en taille moyenne par groupe des vésicules avec un cut-off de 150 nm. N = 6 à 8 souris par groupe. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn : **p<0,01.

Nous avons ensuite voulu déterminer si la présence d'une pathologie tau pouvait influencer la sécrétion vésiculaire. Pour cela, du fluide cérébral a été préparé à partir de cerveaux de souris âgées de 3 mois ou 6 mois, WT et THY-tau30 (développant des inclusions de protéines tau à partir de 3 mois (K. Leroy et al., 2007)). Les VEs ont ensuite été isolées par SEC et leur concentration a été évaluée par NTA (figure 35, A). Il n'existe aucune différence significative entre les différents groupes. De plus, la répartition en taille moyenne des VEs n'est pas différente entre les souris WT et THY-tau30 (Tau30) à 3 mois et à 6 mois (figure 35, B). La présence d'une pathologie tau n'influence donc pas la sécrétion vésiculaire globale dans le cerveau de souris.

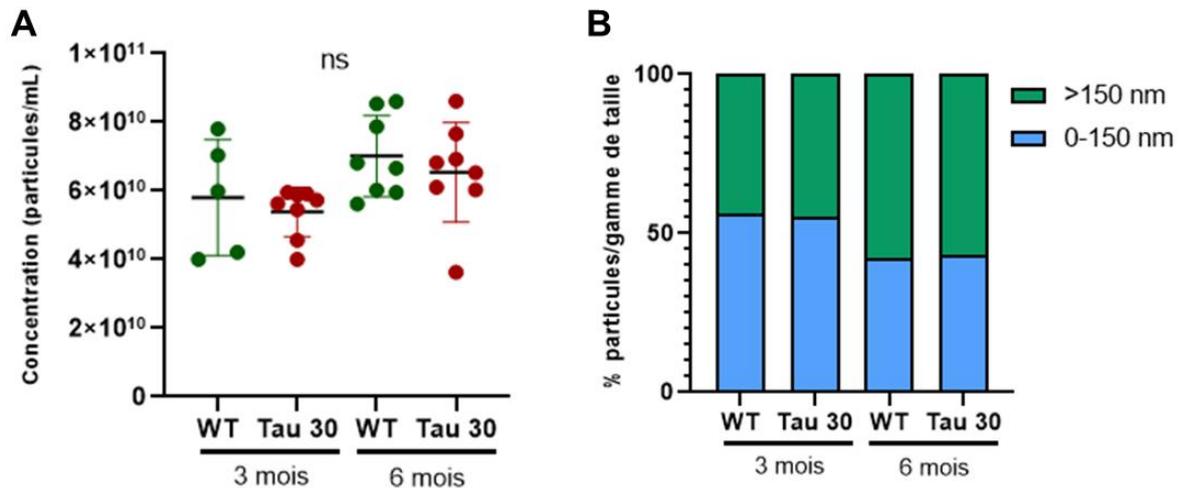


Figure 35 : Influence de la présence d'une pathologie tau sur la sécrétion vésiculaire globale dans le cerveau murin. (A) Concentration vésiculaire dans le FC purifié par SEC de souris WT ou THY-tau30 (Tau30) de 3 ou 6 mois déterminée par NTA. (B) Répartition en taille moyenne par groupe des vésicules avec un cut-off de 150 nm. N = 5 à 8 souris par groupe. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn : p>0,05, ns : non significatif.

Prises ensemble, ces premières données suggèrent fortement que la protéine tau n'est pas directement impliquée dans les mécanismes de biogénèse des VEs et que la présence d'inclusions intracellulaires de protéines tau ne module pas la sécrétion vésiculaire. Toutefois, il s'agit d'une analyse globale des VEs sécrétées à un temps donné. Il est donc possible qu'à un niveau plus local, dans les régions touchées par la pathologie, la sécrétion vésiculaire soit modifiée (concentration, sous-type vésiculaire, origine cellulaire).

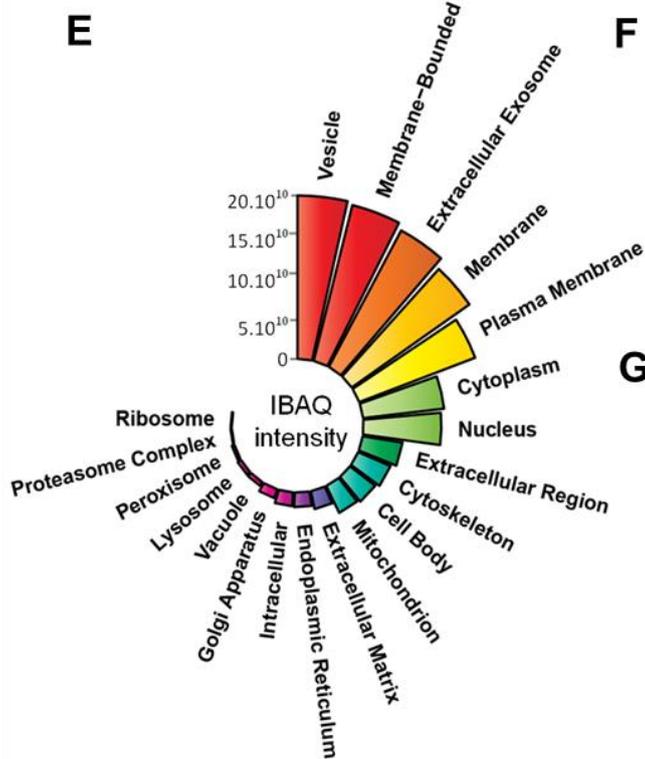
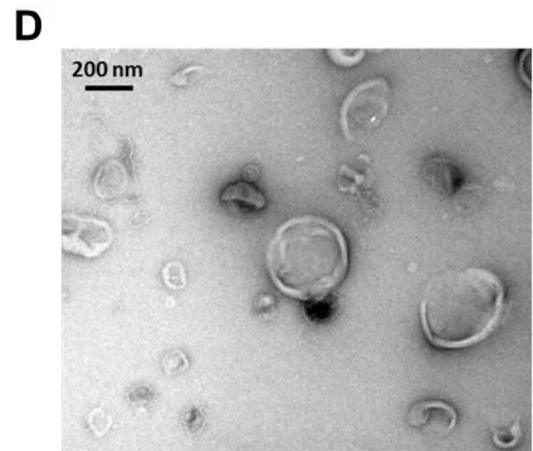
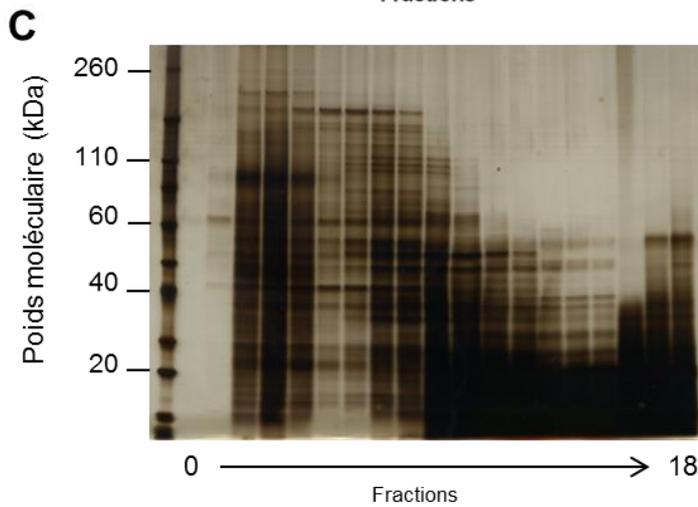
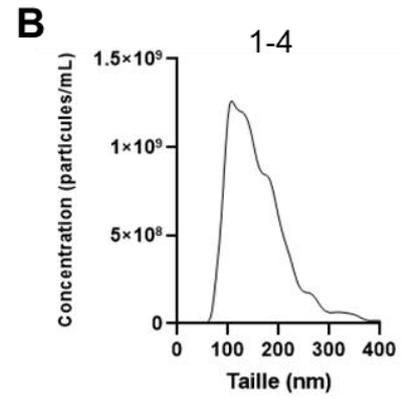
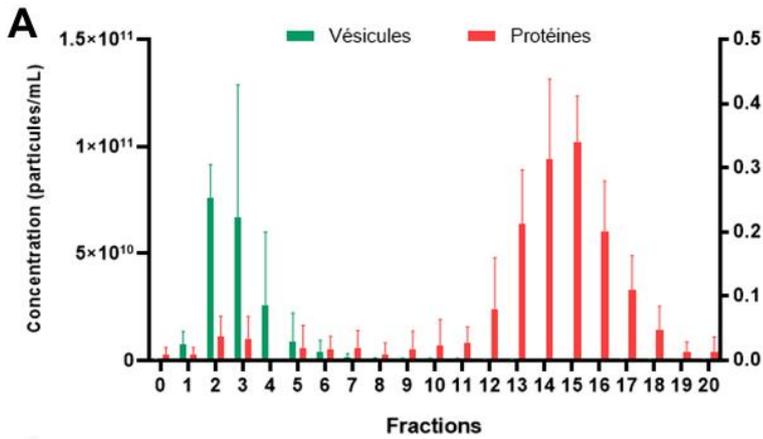
2. Les VEs cérébrales transportent des espèces pro-nucléantes de tau capables de transmettre la pathologie tau in vivo

Les résultats présentés dans cette partie ont donné lieu à une publication : Leroux E.*, Perbet R.* *et al.*, Extracellular vesicles: major actors of heterogeneity in tau spreading among human tauopathies. *Molecular Therapy*, 2021, en révision (Annexe, pages 207 à 246).

Le travail présenté ici vise à comparer la transmission de la pathologie tau via les VEs présentes dans du fluide cérébral (FC) isolé à partir de cerveaux de sujets non déments et de patients atteints de MA, de PSP ou de Pick. Pour cela, nous avons évalué *in vitro* le potentiel des VEs à transporter des espèces pro-nucléantes de tau avant d'évaluer leur capacité à transmettre la pathologie tau *in vivo*.

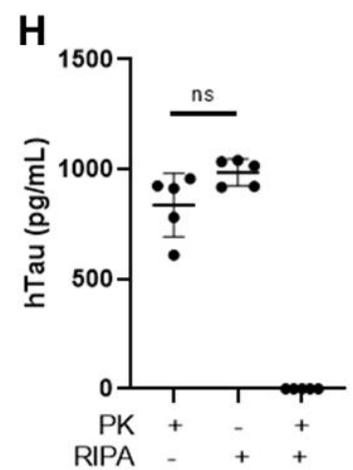
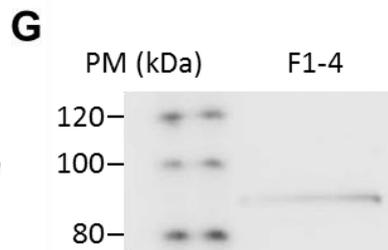
2.1. Le fluide cérébral murin contient des VEs transportant la protéine tau

Nous avons tout d'abord isolé et caractérisé les VEs cérébrales dans un modèle murin transgénique de tauopathie. Les souris THY-tau30 (Tau30) expriment la protéine tau 1N4R humaine mutée (P301S et G272V) sous le contrôle spécifique du promoteur neuronal Thy-1.2 (K. Leroy et al., 2007). Nous avons préparé du fluide cérébral à partir du cerveau entier des souris dépourvu des bulbes olfactifs et du cervelet comme décrit précédemment (Polanco et al., 2016). Les VEs ont ensuite été isolées par SEC. Cette technique a été privilégiée à d'autres car elle permet de séparer les VEs des protéines sécrétées sous forme libre (Böing et al., 2014; Norman et al., 2021). La protéine tau étant sécrétée sous les deux formes (Pérez et al., 2019), il est essentiel de les séparer afin de pouvoir les étudier individuellement. Nous avons validé cette séparation à l'aide d'une quantification vésiculaire et protéique dans chaque fraction de SEC (**figure 36, A et C**). Les fractions 1 à 4 étant enrichies en VEs, elles sont regroupées dans la suite de ce travail et considérées comme correspondant à la fraction VEs. La distribution des VEs en fonction de la taille dans cette fraction met en évidence la présence de VEs de 50 nm à 400 nm (**figure 36, B**). La présence de VEs a été confirmée par microscopie électronique (**figure 36, D**). La morphologie des VEs isolées est conservée. Une analyse protéomique de cette fraction par MALDI-TOF LC-MS/MS a été réalisée par le groupe du Dr. Kévin Richetin au Centre des Neurosciences Psychiatriques de Lausanne. L'analyse quantitative des données a permis d'identifier 2064 protéines dont 1635 (79%) sont référencées dans la base de données de Vesiclepedia. La quantification absolue basée sur l'intensité (scores IBAQ) combinée à l'annotation des *Gene Ontology* pour les composants cellulaires (GOCC) a révélé que les termes GOCC associés aux VEs représentent 76% des scores IBAQ totaux pour les 20 composants cellulaires sélectionnés (**figure 36, E**). Parmi les protéines recommandées dans le MISEV 2018 (Théry et al., 2018), nous avons identifié une majorité de protéines dans les catégories 1a (protéines transmembranaires non spécifiques aux tissus) et 2a (protéines cytosoliques présentes dans les VEs) (**figure 36, F**). Parmi elles se trouvent les marqueurs vésiculaires cytosoliques, HSP90 et la protéine tau. Leur présence a été validée respectivement par western-blot (**figure 36, G**) et par ELISA hTau (**figure 36, H**). À l'aide de protéinase K (PK), nous avons mis en évidence que la protéine tau se trouve bien à l'intérieur des VEs. En effet, la protéolyse des protéines extravésiculaires à l'aide de la PK n'affecte pas la concentration de tau dans les VEs (**figure 36, H**). La caractérisation de la fraction VEs isolée par SEC à partir de fluide cérébral murin par NTA, dosage protéique, coloration à l'argent, microscopie électronique, analyse protéomique, western-blot et ELISA permet de valider que cette fraction est bien enrichie en VEs.



F

MISEV 2018 recommended category	1a	2a	3a	4a	5a
Detected	Adam10; Bsg; Cd47; Cd81; Cd82; Gna*; Hspg*; Igta*; Igtb*; Lamp1; Lamp2; Nt5e; Sdc*	Anxa*; Arf6; Chmp*; Ehd*; Flot1; Flot2; Hsp90ab1; Hspa8; Mapt; Pdcd6ip; Rhoa; Sdcbp; Tsg101; Vps4b	Alb; Apoa1	Hist1h**	



(figure page précédente)

Figure 36 : Le fluide cérébral murin contient des VEs. 500 µL de FC de souris sont purifiés par SEC pour séparer les VEs des protéines libres. Dans chaque fraction de 500 µL collectée, la concentration vésiculaire est évaluée par NTA (n=3) (vert, **A**) et la concentration protéique est évaluée par spectrophotométrie UV (n=3) (rouge, **A**) ou par coloration à l'argent (**C**). Les fractions 1 à 4 sont rassemblées pour constituer la fraction vésiculaire. Le profil vésiculaire moyen (n=3) (**B**) et la morphologie des VEs (**D**) dans ces fractions sont évalués respectivement par NTA et par microscopie électronique. Les protéines présentes dans ces fractions sont identifiées par analyse protéomique quantitative. (**E**) Diagramme illustrant les scores d'intensité IBAQ obtenus pour 20 GO term Cellular Component. (**F**) Tableau répertoriant les protéines identifiées selon les catégories recommandées par le MISEV 2018 pour évaluer la présence de VEs (et de contaminants co-isolés : 3a). * est utilisé pour les familles de protéines multiples, par exemple pour les intégrines : Igt* indique toute chaîne alpha d'intégrine. (**G**) La présence de la protéine HSP90 est validée par western-blot. PM = Poids moléculaire. (**H**) La présence intravésiculaire de la protéine tau est confirmée par ELISA hTau après protéolyse des protéines extravésiculaires par la protéinase K (PK +, RIPA -) de la fraction 1-4. Test de Mann-Whitney $p > 0,05$, ns = non significatif.

2.2. Les VEs cérébrales transportent des espèces pro-nucléantes de tau dans un modèle murin de tauopathie

Afin de déterminer si les VEs cérébrales peuvent transporter des espèces pro-nucléantes de tau, nous avons préparé du fluide cérébral à partir de souris Tau30 âgées de 1, 3 et 6 mois. Du fluide cérébral de souris WT aux mêmes âges et du fluide cérébral de souris APP/PS1 âgées de 6 mois ont été utilisés comme contrôle négatif. Les souris APP/PS1 développent uniquement des dépôts amyloïdes sans pathologie tau (Jankowsky et al., 2001, 2004). Les lésions liées à la protéine tau présentes dans le cerveau de ces souris ont été caractérisées par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps MC1 et AT100. L'anticorps MC1 reconnaît un changement conformationnel de la protéine tau (Allen et al., 2002; Jeganathan et al., 2008; Jicha et al., 1997). L'anticorps AT100 reconnaît des sites de phosphorylation anormale présents dans les formes insolubles et agrégées de tau uniquement (Anderson et al., 2008; Hoffmann et al., 1997; Yoshida & Goedert, 2006; Zheng-Fischhöfer et al., 1998). Une immunoréactivité MC1 (**figure 37, a-g**) et AT100 (**figure 37, h-n**) est progressivement détectée dans la CA1 de l'hippocampe des souris Tau30 entre 1 et 6 mois. À 1 mois, l'immunoréactivité est encore peu voire pas marquée alors qu'à 3 mois, nous pouvons identifier des corps cellulaires marqués, qui sont d'autant plus nombreux à 6 mois. Aucune immunoréactivité MC1 et AT100 n'est observée chez les souris WT et les souris transgéniques APP/PS1.

(figure page suivante)

Figure 37 : Illustrations des lésions tau dans l'hippocampe de souris Tau30. Immunomarquage anti-MC1 (a-g) et anti-AT100 (h-n) dans l'hippocampe de souris APP/PS1 (6 mois), WT et Tau30 (1, 3 et 6 mois). Les flèches indiquent les lésions qui apparaissent majoritairement dans le corps cellulaire des neurones pyramidaux de la CA1. Des grossissements des lésions sont présents sur les photos g et n. Une coloration des coupes au violet de crésyl permet de marquer les noyaux. Les barres d'échelle pour chacun des deux grossissements sont indiquées sur la figure. LMol = Couche lacunosum-moleculare, DS = Subiculum dorsal, pyr = cellules pyramidales de la CA1.

Âge
(mois)

MC1

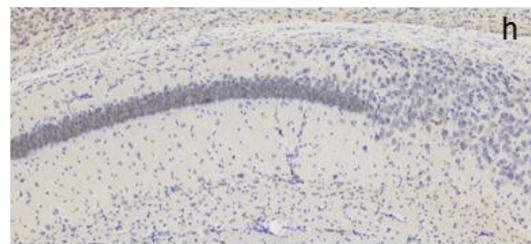
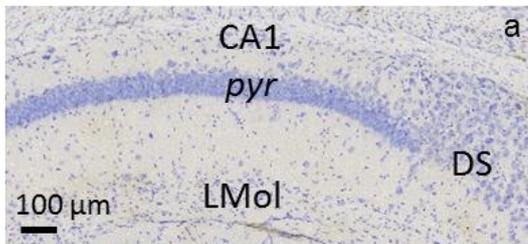
AT100

APP/PS1

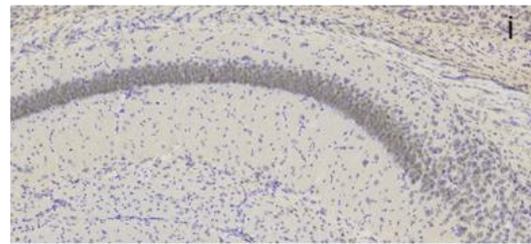
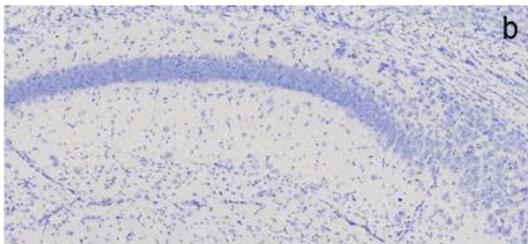
WT

Tau30

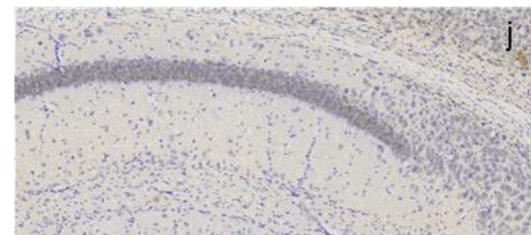
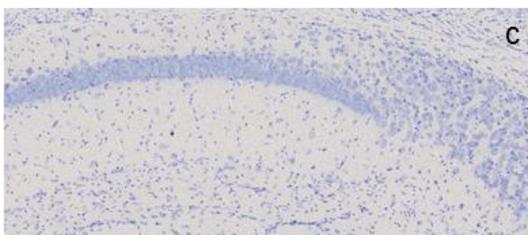
6



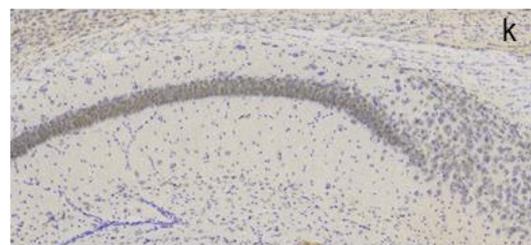
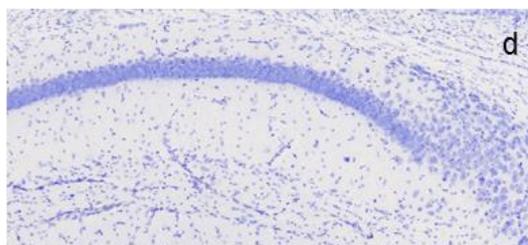
1



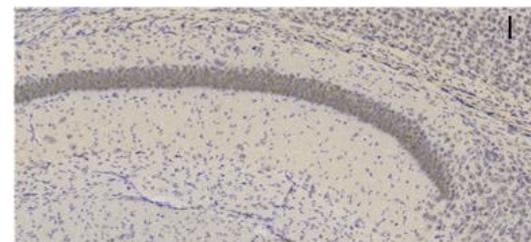
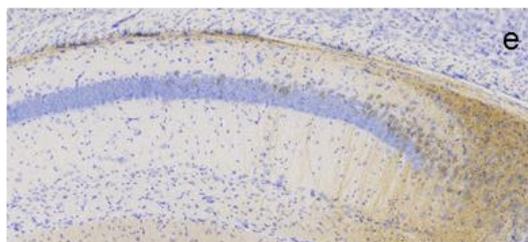
3



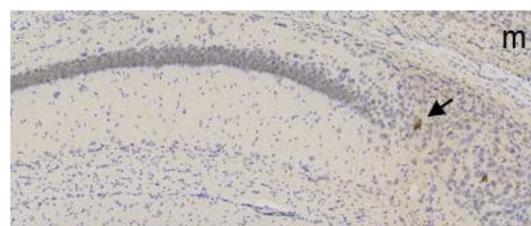
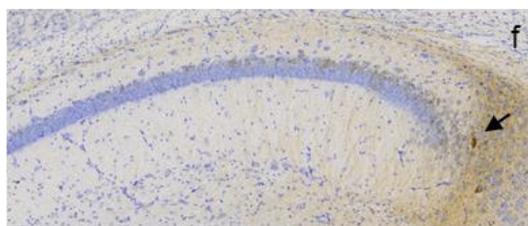
6



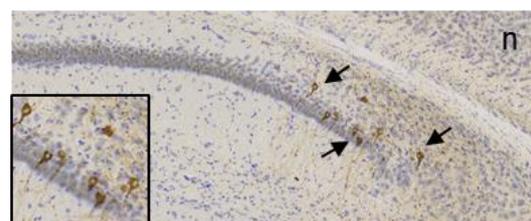
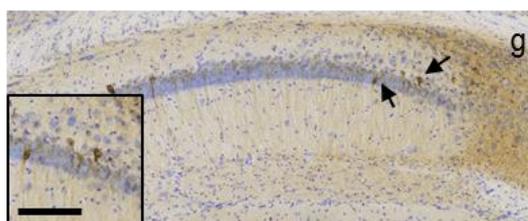
1



3



6



Nous avons ensuite évalué la capacité de nucléation des VEs isolées à partir du fluide cérébral de ces souris à l'aide d'un modèle cellulaire semi-quantitatif de nucléation de tau basé sur le principe du transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, le FRET (Holmes et al., 2014). Il s'agit d'une lignée cellulaire HEK 293T qui exprime de façon stable les 4 domaines de répétition de la protéine tau mutée (P301S) solubles couplés à une CFP ou à une YFP. En présence d'espèces pro-nucléantes, comme des fibres de protéines tau recombinantes, la nucléation et l'oligomérisation de tau entraîne un rapprochement dans l'espace de la CFP et de la YFP. Un transfert d'énergie entre les deux fluorochromes est alors possible lorsque la CFP est excitée. Le signal de la YFP est alors enregistré. Les VEs sont transfectées dans ces cellules à l'aide de lipofectamine. 72 h après, l'activité de nucléation est quantifiée par cytométrie en flux (**figure 38, A**). Pour les VEs de souris Tau30, un signal significativement supérieur à celui des VEs des souris WT et APP/PS1 est enregistré à 3 et 6 mois. La présence d'espèces pro-nucléantes dans les VEs augmente avec l'évolution de la pathologie chez les Tau30. Afin de s'assurer que ce signal est bien dû aux VEs, nous avons déplété les VEs de souris Tau30 âgées de 3 mois dans la fraction 1-4 de SEC par ultracentrifugation à 100 000 g pendant 50 min. Cela permet de culoter les VEs qui ne sont alors plus présentes dans le surnageant. Nous pouvons constater que le signal FRET enregistré est significativement réduit lorsque les VEs ne sont plus présentes (**figure 38, B**). Ensuite, afin de valider que le signal FRET enregistré chez ces mêmes souris est bien lié à la protéine tau, nous l'avons immunodéplété des VEs (**figure 38, C**). En l'absence de sonication des VEs, la protéine tau n'est pas immunodéplétée confirmant une nouvelle fois qu'elle est bien présente à l'intérieur des VEs. L'immunodéplétion de tau dans les VEs soniquées a, quant à elle, permis de réduire significativement la présence de protéines tau dans les VEs. L'analyse en FRET de ces VEs montre une diminution significative du signal par rapport à la condition contrôle alors que sans sonication des VEs le signal FRET n'est pas significativement réduit (**figure 38, D**). Cela confirme que la nucléation dans le modèle FRET est bien déclenchée par des espèces de tau présentes dans les VEs. Ces données soutiennent donc l'idée que des VEs contenant des espèces pro-nucléantes de tau sont libérées dans le cerveau en lien avec l'apparition et l'évolution de la pathologie tau dans un modèle murin de tauopathie.

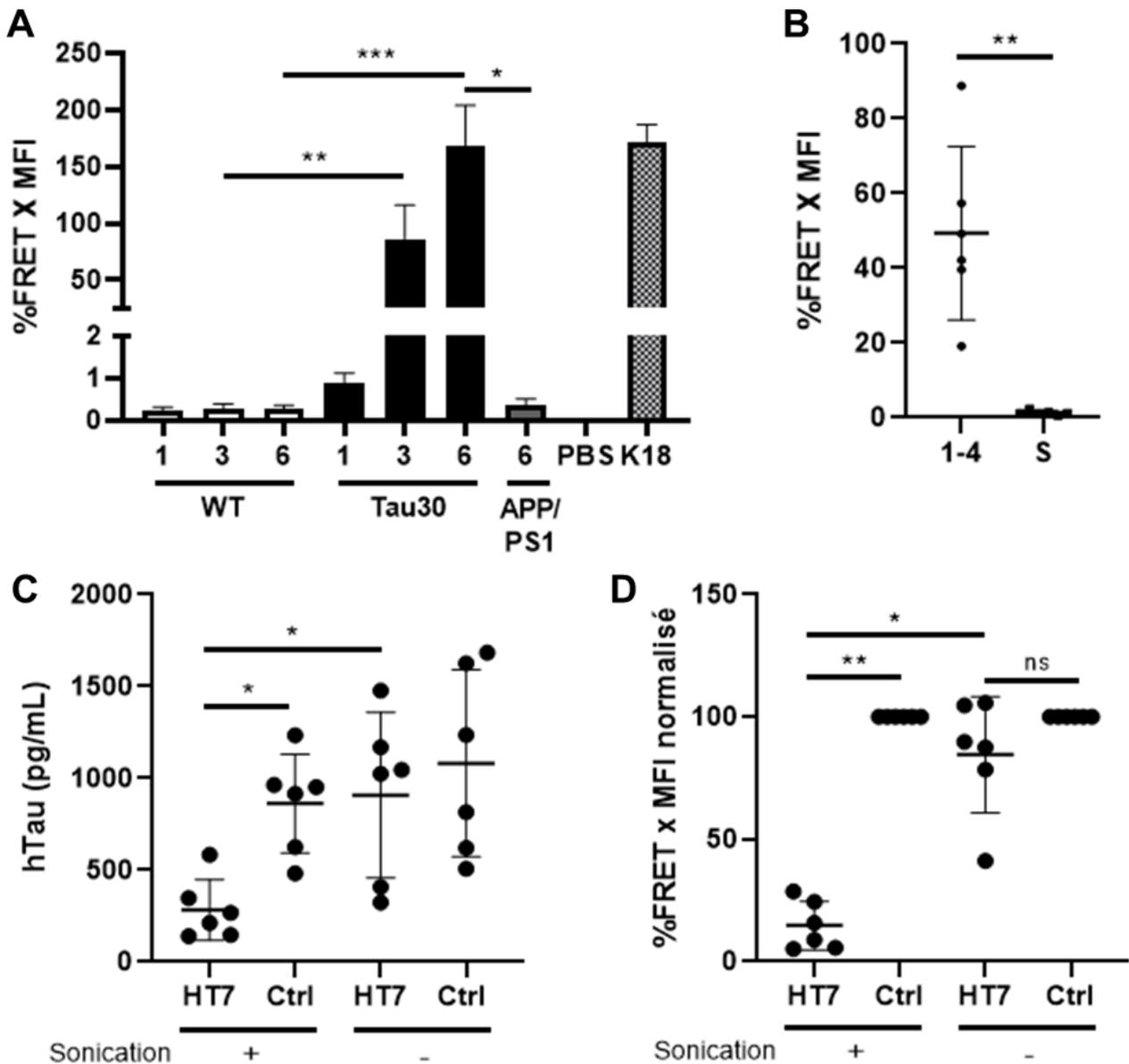
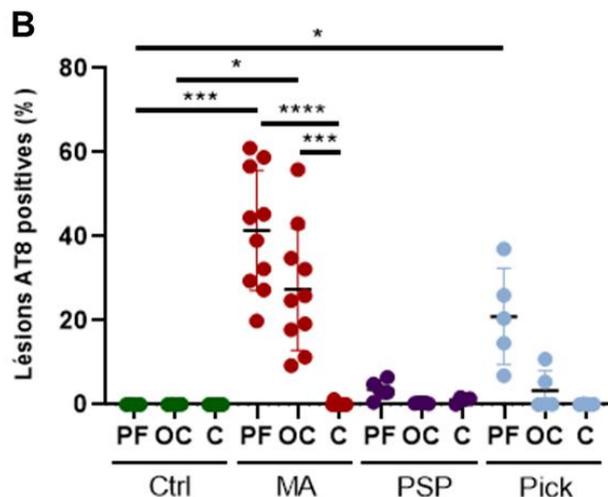
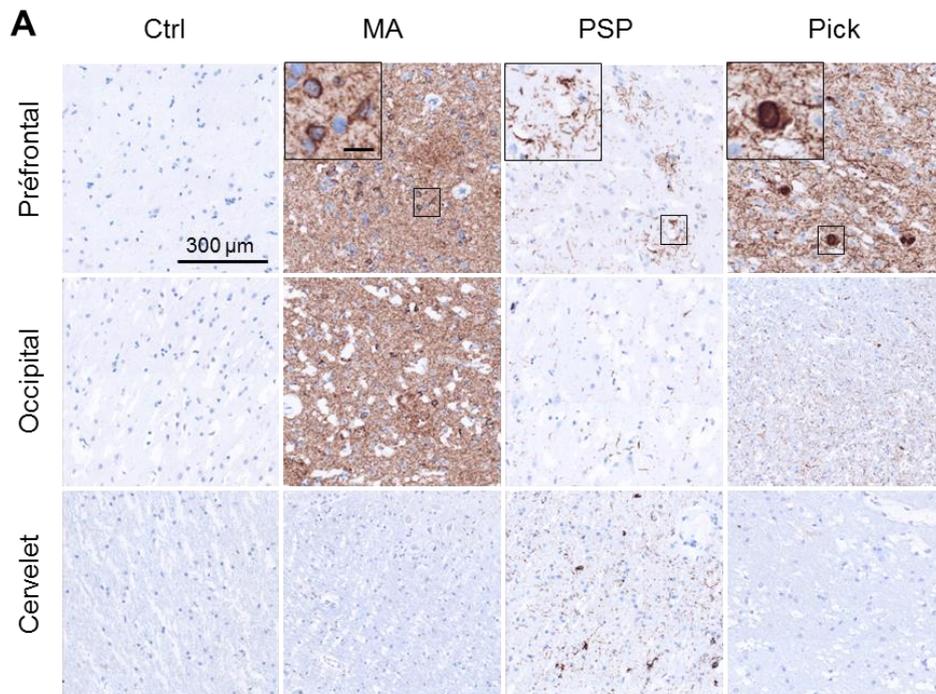


Figure 38 : Des espèces pro-nucléantes de tau sont présentes dans les VEs cérébrales d'un modèle murin de tauopathie. (A) Les VEs issues de 500 μ L de FC de souris WT (1 mois : n=8; 3 mois : n=6; 6 mois : n=8), Tau30 (1 mois : n=7; 3 mois : n=8; 6 mois : n=8) et APP/PS1 (6 mois : n=6) sont transfectées dans le modèle cellulaire de FRET. Du PBS et 2 nM de fibres K18 sont utilisés respectivement comme contrôle négatif et positif. (B) Transfection de 100 μ L de la fraction 1-4 de FC de souris Tau30 âgées de 3 mois ou de 100 μ L du surnageant (S) (après ultracentrifugation 50 min à 100 000g de la fraction 1-4) dans le modèle FRET. (C) ELISA hTau après immunodéplétion (avec ou sans sonication) des VEs de souris Tau30 de 3 mois. L'anticorps HT7 est utilisé pour immunodépléter tau tandis qu'un anticorps IgG1 est utilisé comme contrôle négatif de l'immunodéplétion. (D) Les mêmes échantillons sont transfectés dans le modèle FRET. Pour chaque condition expérimentale (+ ou - sonication), les résultats pour HT7 sont normalisés au signal de la condition contrôle (Ctrl). Le signal obtenu par cytométrie en flux est exprimé en pourcentage de signal FRET x intensité du signal (%FRET x MFI). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn : *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; p>0,05 : ns = non significatif.

2.3. Les VEs cérébrales transportent des espèces pro-nucléantes dans plusieurs tauopathies sporadiques

Après avoir montré la présence de VEs contenant des espèces pro-nucléantes de tau dans le cerveau de souris transgéniques développant une pathologie tau, nous avons voulu confirmer ces données chez l'Homme. Compte tenu de l'hétérogénéité qui existe entre les tauopathies, présentée en introduction, nous nous sommes demandé si la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs peut varier selon la tauopathie considérée.

Pour cela, nous avons préparé du fluide cérébral à partir de cerveaux de sujets contrôles non déments (n=5), de patients MA (n=10), PSP (n=10) et Pick (n=5) (tableau 6, Annexe page 203) dans 3 régions différemment affectées par la pathologie (cortex préfrontal, cortex occipital, cervelet). Les lésions liées à la protéine tau ont été quantifiées par immunohistochimie dans les régions adjacentes à celles ayant servi à préparer le fluide cérébral (figure 39). L'anticorps AT8 reconnaît des formes hyperphosphorylées de la protéine sans réaction croisée avec la protéine tau non phosphorylée (Malia et al., 2016). Comme attendu, la pathologie tau est plus importante dans la MA que dans la PSP ou dans Pick. Toutefois, cela dépend de la région considérée. En effet, dans le cervelet des patients MA, aucune immunoréactivité AT8 n'est observée.



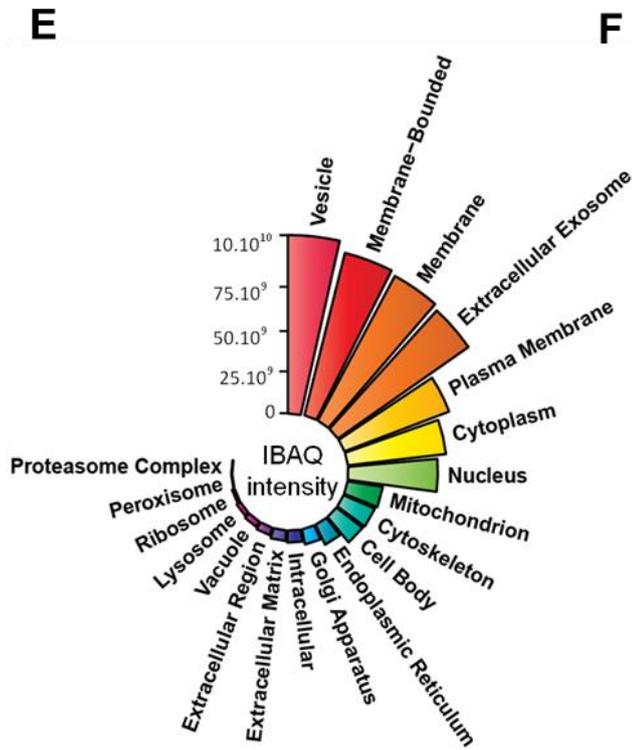
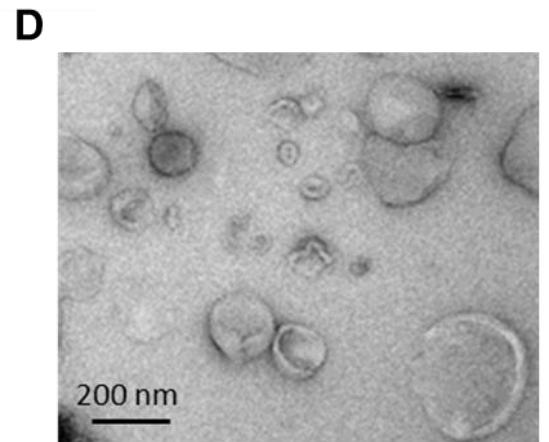
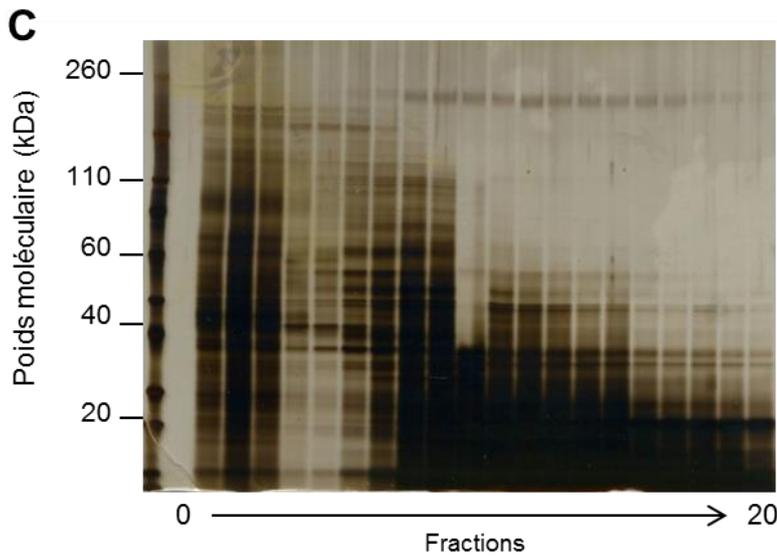
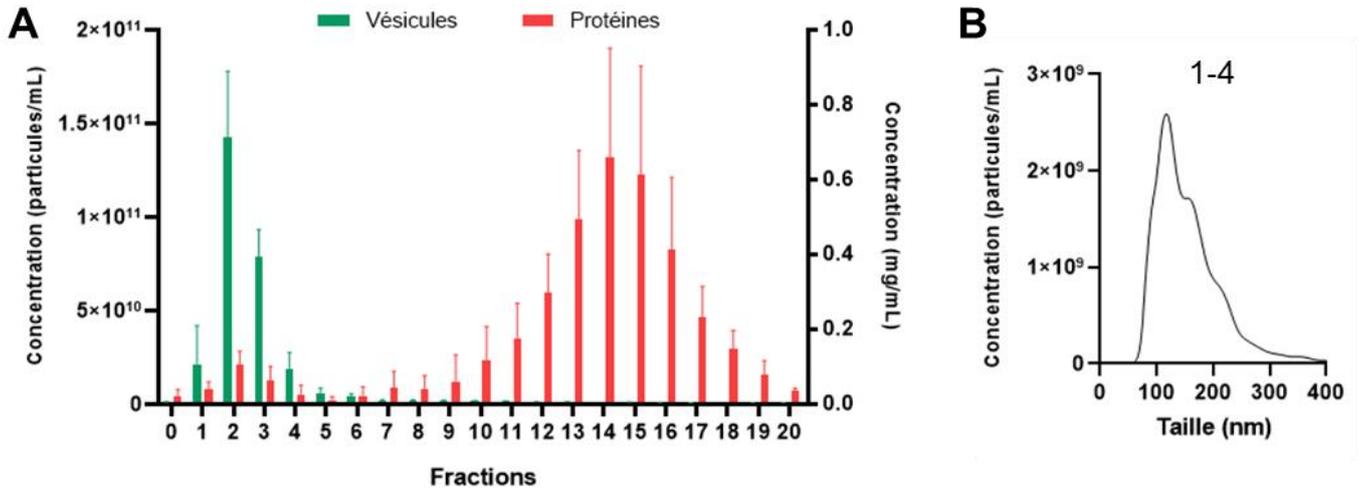
(figure page précédente)

Figure 39 : Illustrations et quantification des lésions tau dans les tauopathies. (A) Immunomarquage anti-AT8 dans les régions préfrontale, occipitale et cérébelleuse adjacentes à celles utilisées pour préparer le FC. Des grossissements des lésions sont présents pour chaque tauopathie. Une coloration des coupes au violet de crésyl permet de marquer les noyaux. (B) Quantification de l'immunoréactivité dans chaque région pour les sujets contrôles (n=5), les patients MA (n=10), les patients PSP (n=5) et les patients Pick (n=5). Les résultats sont exprimés en pourcentage de lésions ([pixels positifs AT8/pixels totaux] x100). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn : *p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001.

De la même façon que pour le fluide cérébral murin, les VEs ont été isolées à partir du fluide cérébral humain. La caractérisation des fractions de SEC et de la fraction 1-4 est présentée sur la **figure 40**. Elle confirme une nouvelle fois la présence de VEs de 50 nm à 400 nm. L'analyse protéomique confirme un enrichissement de protéines associées aux VEs. Ici, la présence de la tétraspanine transmembranaire CD63 décrite comme étant associée aux VEs est validée par immunomarquage à l'or en microscopie électronique (**figure 40, G**).

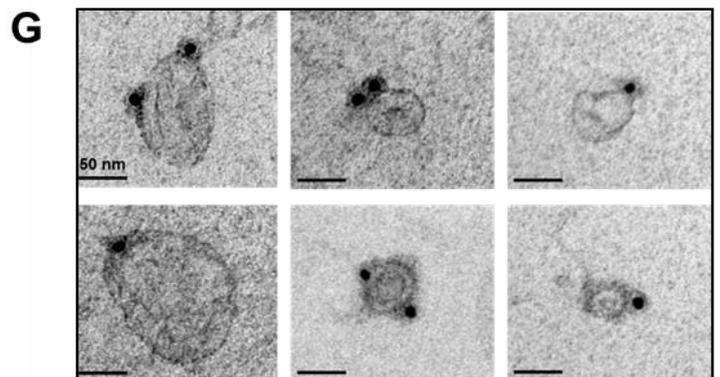
(figure page suivante)

Figure 40 : Le fluide cérébral humain contient des VEs. 500 µL de FC humain sont purifiés par SEC pour séparer les VEs des protéines libres. Dans chaque fraction de 500 µL collectée, la concentration vésiculaire est évaluée par NTA (n=3) (vert, **A**) et la concentration protéique est évaluée par spectrophotométrie UV (n=3) (rouge, **A**) ou par coloration à l'argent (**C**). Les fractions 1 à 4 sont rassemblées pour constituer la fraction vésiculaire. Le profil vésiculaire moyen (n=3) (**B**) et la morphologie des VEs (**D**) dans ces fractions sont évalués respectivement par NTA et par microscopie électronique. Les protéines présentes dans ces fractions sont identifiées par analyse protéomique quantitative. (**E**) Diagramme illustrant les scores d'intensité IBAQ obtenus pour 20 *GO term Cellular Component*. (**F**) Tableau répertoriant les protéines identifiées selon les catégories recommandées par le MISEV 2018 pour évaluer la présence de VEs (et de contaminants co-isolés : 3a). * est utilisé pour les familles de protéines multiples, par exemple pour les intégrines : Igta* indique toute chaîne alpha d'intégrine. (**G**) La présence de la tétraspanine CD63 est validée par immunomarquage avec des billes d'or en microscopie électronique.



F

MISEV 2018 recommended category	1a	2a	3a	4a	5a
Detected	ADAM10; BSG; CD47; CD55; CD59; CD63; CD81; CD82; GNA*; HLA-A; HSPG*; IGTA*; IGTB*; LAMP1; LAMP2; NT5E; SDC*	ANXA*; ARF6; CAV*; CHMP*; EHD*; FLOT1; FLOT2; HSP90AB1; HSPA8; MAPT; PDCD6IP; RHOA; SDCBP; TSG101; VPS4A; VPS4B	APOA1; APOB;	HIST1H **; LMNA	FGF1



Contrairement aux souris où l'ensemble du cerveau a été analysé, seules certaines régions spécifiques du cerveau humain ont été disséquées pour préparer le fluide cérébral. Pour éviter tout biais, les résultats ont été systématiquement normalisés au poids du tissu utilisé pour préparer le fluide cérébral.

Pour chaque échantillon, la concentration vésiculaire (**figure 41, A**) et la concentration en protéine tau (**figure 41, B**) dans les VEs ont été évaluées. Elles ne montrent pas de différence entre les tauopathies ni entre les régions étudiées bien qu'il existe une hétérogénéité importante. Cela va dans le même sens que les données obtenues sur la sécrétion vésiculaire globale dans le fluide cérébral de souris (**figure 35**). Il est intéressant de noter que les VEs issues du fluide cérébral des sujets contrôles contiennent des concentrations en protéine tau similaires à celles observées dans les VEs des patients atteints de tauopathies. Cela démontre que, dans le cerveau humain, la protéine tau est physiologiquement sécrétée dans les VEs cérébrales. Nous confirmons ainsi les données de la littérature générées à partir de modèles cellulaires et animaux (Croft et al., 2017; Pooler et al., 2013).

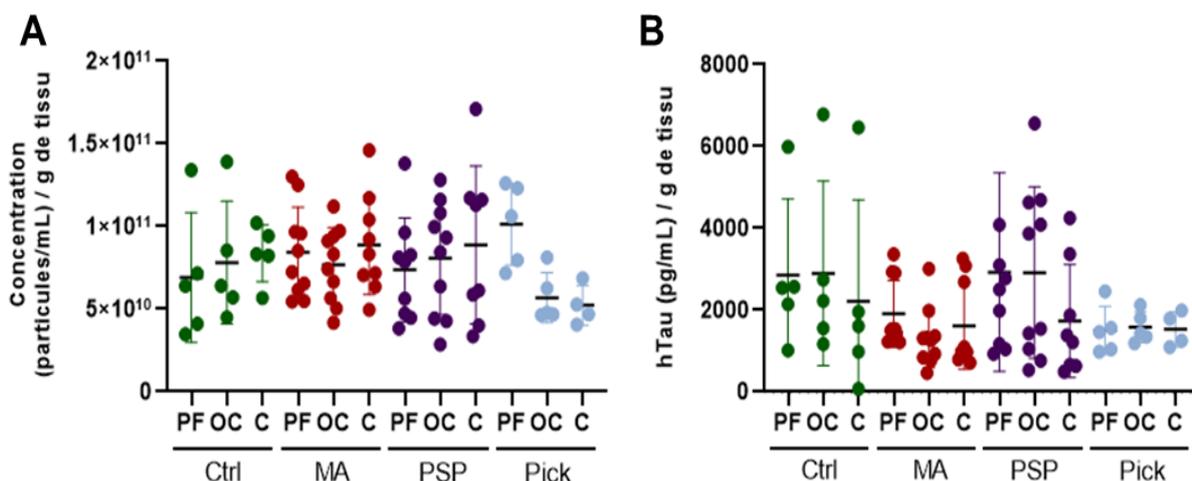
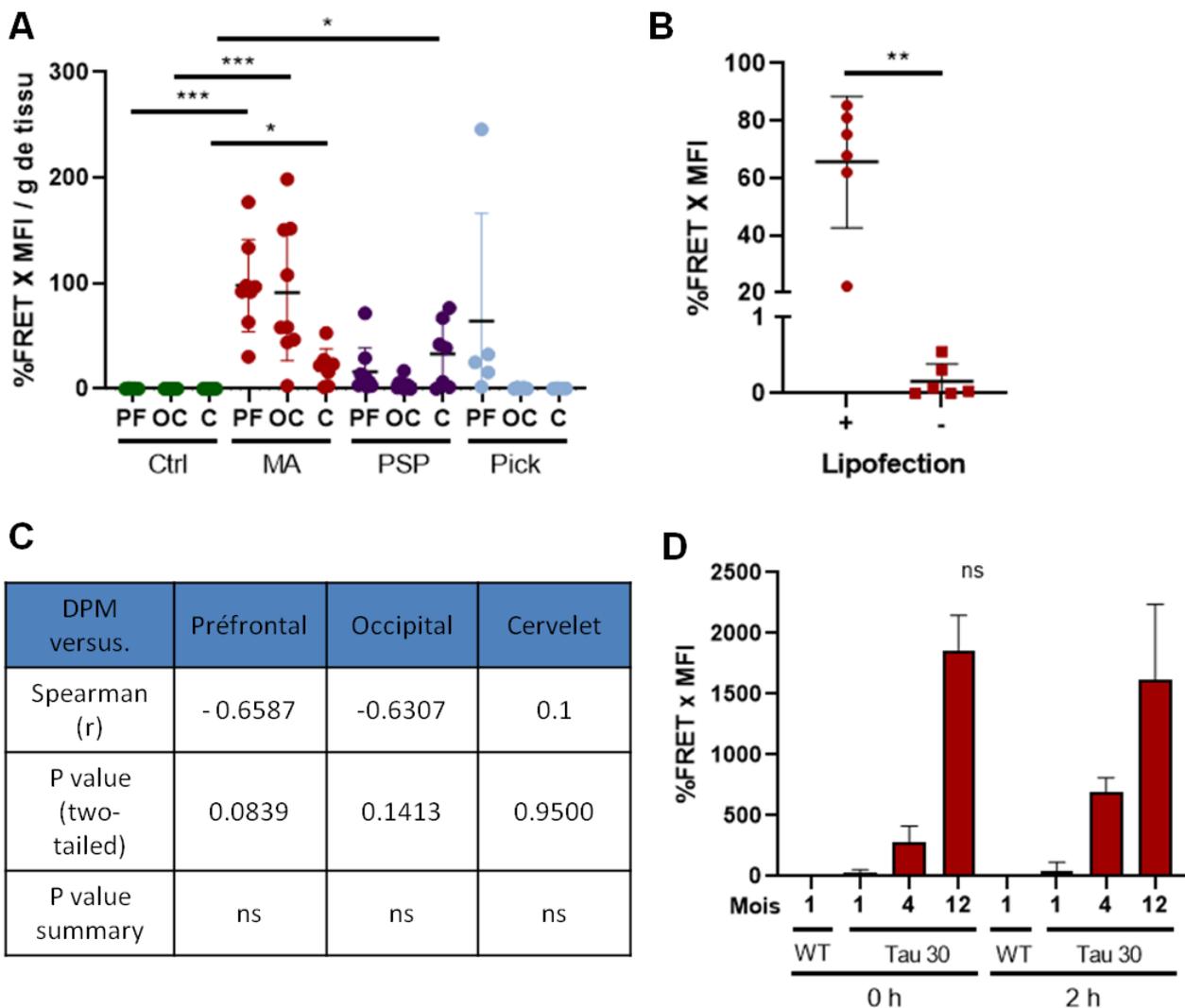


Figure 41 : La sécrétion vésiculaire de tau n'est pas modifiée par la présence d'une pathologie tau. Des VEs issues de 500 μ L de FC sont purifiées par SEC (Ctrl n=5, MA n=10, PSP n=10, Pick n=5). La concentration vésiculaire est déterminée par NTA (A). La concentration vésiculaire en protéines tau est déterminée par ELISA hTau (B). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn : $p > 0,05$.

Afin de déterminer si les VEs contiennent des espèces pro-nucléantes de tau et s'il existe des différences entre les tauopathies, elles ont été transfectées dans le modèle de FRET décrit précédemment (**figure 42, A**). L'utilisation de lipofectamine nous permet de nous affranchir des limites de l'internalisation des VEs humaines dans le modèle cellulaire HEK 293T, de façon à étudier uniquement le contenu des VEs et de pouvoir comparer les tauopathies entre elles. En effet, sans lipofectamine, nous constatons que le signal FRET enregistré est très faible (**figure 42, B**). Son utilisation nous a permis de montrer que les VEs du fluide cérébral préfrontal et occipital des patients MA induisent un signal FRET significatif par rapport aux sujets contrôles (**figure 42, A**). Dans le cervelet de ces patients, qui est pourtant dépourvu de lésions, des VEs induisent également un signal FRET significatif par rapport aux sujets contrôles. Pour les patients PSP et Pick, un signal FRET plus faible que dans la MA est enregistré dans les régions

touchées par la pathologie. Toutefois, il n'est significativement différent des sujets contrôles que dans le cervelet des patients PSP. Cela est cohérent avec le fait que les lésions sont moins importantes dans ces tauopathies, comparativement à la MA. Il est intéressant de noter que pour un patient Pick, le signal FRET obtenu avec les VE's préfrontales est élevé. Ce patient présente, en plus des corps de Pick, des DNF caractéristiques de la MA ([tableau 6, Annexe page 203](#)), ce qui pourrait potentiellement expliquer ce résultat. Le signal FRET obtenu à partir des VE's humaines ne semble pas refléter une libération passive de vésicules intracellulaires due à la mort cellulaire car il n'existe pas de corrélation entre le délai post-mortem (DPM) et le signal FRET ([figure 42, C](#)). Pour contrôler plus rigoureusement l'impact du DPM, nous sommes repassés sur des modèles murins car le DPM chez l'Homme n'est pas un facteur que nous pouvons contrôler. Dans le modèle murin Tau30, l'application d'un DPM de 2 h avant la dissection ne modifie pas le signal FRET lié aux VE's du fluide cérébral ([figure 42, D](#)). Pris ensemble, ces résultats montrent que dans le cerveau humain, bien que les concentrations de protéine tau sécrétée dans les VE's soient similaires, la capacité des VE's à transporter des espèces pro-nucléantes de tau varie selon les régions et la tauopathie considérées.

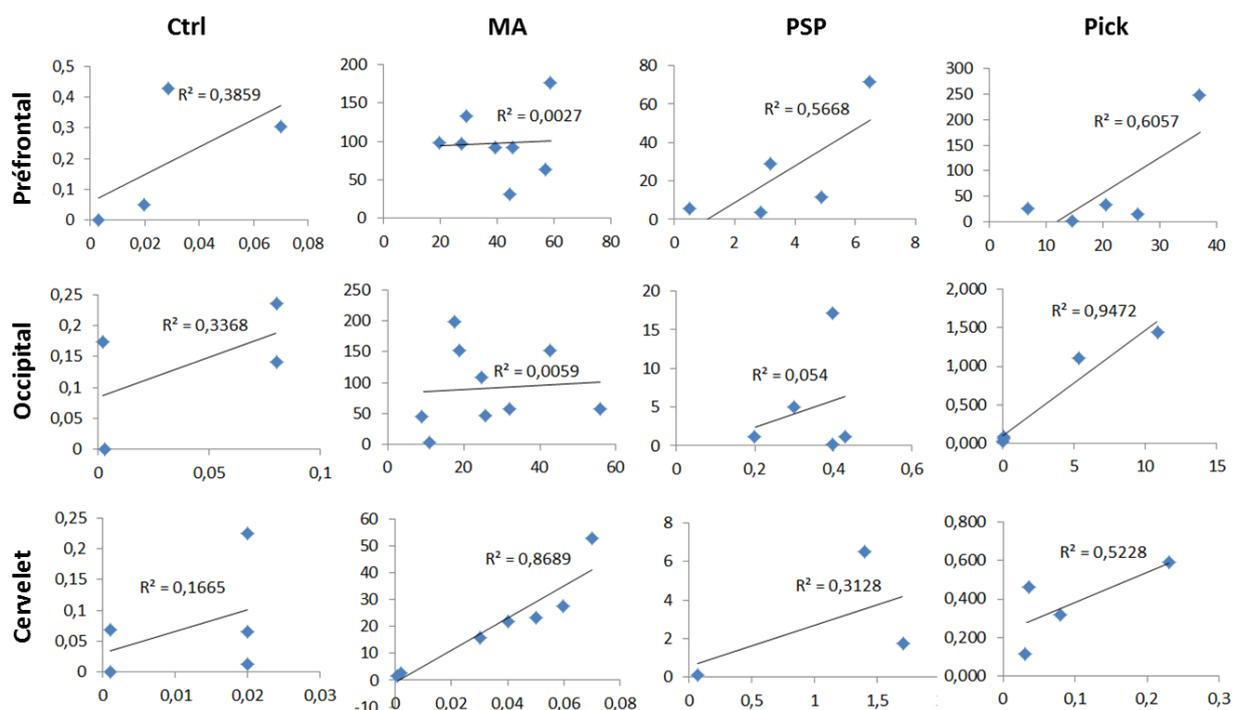


(figure page précédente)

Figure 42 : Les VEs cérébrales de patients atteints de tauopathies contiennent des espèces pro-nucléantes. Des VEs issues de 500 µL de FC sont purifiées par SEC (Ctrl n=5, MA n=10, PSP n=10, Pick n=5) et transfectées dans le modèle FRET (A). Les données sont normalisées au poids du tissu utilisé pour préparer le FC. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn : *p<0,05; ***p<0,001. (B) Impact de la lipofection des VEs sur le signal FRET. Des VEs issues de FC préfrontal de patients MA ont été transfectées dans le modèle FRET avec (+) ou sans (-) lipofectamine. Test de Mann-Whitney : **p<0,01. (C-D) Le délai post-mortem (DPM) n'influence pas le signal FRET : (C) Corrélation de Spearman non paramétrique entre le DPM et le signal FRET obtenu avec les VEs de FC du cortex préfrontal, du cortex occipital et du cervelet pour la MA. La valeur du coefficient de corrélation (r) et la valeur de p associée sont représentées. (D) Du FC a été préparé à partir de cerveaux de souris WT (1 mois) et Tau30 (1, 4 et 12 mois) prélevés et congelés immédiatement après la mort (0 h) ou après un DPM de 2 h. Les VEs issues de ce FC sont transfectées dans le modèle FRET. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn comparant les souris du même âge sans DPM ou avec : ns = non significatif. Le signal obtenu par cytométrie en flux est exprimé en pourcentage de signal FRET x intensité du signal (%FRET x MFI).

2.4. Lien entre la pathologie tau et la présence d'espèces pro-nucléantes dans les VEs dans plusieurs tauopathies sporadiques

Face aux profils obtenus en FRET après transfection des VEs humaines et à celui des lésions tau dans les différentes régions, nous avons souhaité savoir si la présence d'espèces pro-nucléantes dans les VEs était corrélée à l'intensité de la lésion, comme cela semble être le cas chez la souris. Pour cela nous avons représenté graphiquement le signal FRET lié aux VEs en fonction de la lésion tau (figure 43). Le signal FRET ne semble pas être corrélé à la lésion. Cependant, le nombre d'échantillons analysés est trop faible pour pouvoir interpréter correctement ces données. Elles reflètent davantage l'hétérogénéité qui existe entre les différents patients atteints d'une même tauopathie.



(figure page précédente)

Figure 43 : Corrélation entre le signal FRET des VEs de FC humain et la lésion tau dans chaque région et pour chaque groupe de sujets. Représentation graphique du signal obtenu en FRET (ordonné : %FRET x MFI/g de tissu) en fonction de la lésion tau (abscisse : % de lésions AT8 positives) pour chaque échantillon (Ctrl n=5, MA n=10, PSP n=5, Pick n=5). La droite de régression et le coefficient de détermination (R^2) sont représentés.

Dans cette étude, la lésion tau est quantifiée uniquement avec l'anticorps AT8. Or, dans la littérature, il est décrit que l'activité de nucléation évaluée avec le modèle FRET peut précéder l'apparition du marquage AT8 dans des modèles murins de tauopathies (Holmes et al., 2014; Kaufman et al., 2017). Lors de la préparation du fluide cérébral, les cellules et les débris cellulaires, appelés ici « fraction cellulaire », sont éliminés du fluide par centrifugations successives. La présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans la fraction cellulaire a été étudiée dans le modèle FRET à la suite de la transfection de 10 µg de protéines totales dans les cellules (figure 44). Comparativement aux sujets contrôles, un signal FRET significatif est obtenu dans les régions préfrontale et occipitale des patients MA. Pour le cervelet des patients MA et pour les autres tauopathies, le signal FRET n'est pas significativement différent des sujets contrôles bien qu'un signal soit tout de même enregistré dans certaines régions telles que dans le cervelet des patients MA. Ces données suggèrent que des espèces pro-nucléantes sont présentes dans les cellules, y compris dans les régions dépourvues de lésions apparentes à la suite d'un immunomarquage AT8.

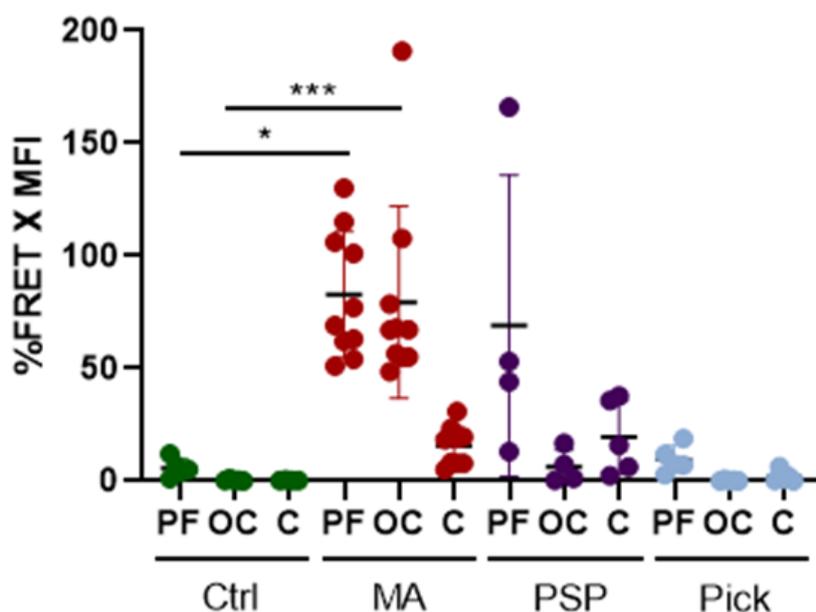


Figure 44 : Espèces pro-nucléantes dans la fraction cellulaire du FC humain. Lors de la préparation du FC, des étapes de centrifugation permettent d'éliminer les cellules et les débris cellulaires. Après dosage protéique de cette fraction cellulaire, 10 µg de protéines pour chaque région de chaque individu sont transfectés dans le modèle FRET. Le signal obtenu par cytométrie en flux est exprimé en pourcentage de signal FRET x intensité du signal (%FRET x MFI). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn : * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Face au profil de FRET obtenu dans la fraction cellulaire, nous avons souhaité savoir s'il était davantage corrélé aux lésions que le signal FRET obtenu avec les VEs. Pour cela nous avons représenté graphiquement le signal FRET lié à la fraction cellulaire en fonction de la lésion tau (**figure 45**). Le signal ne semble pas corrélé davantage avec la lésion. Toutefois, là encore, le nombre d'échantillons analysés est trop faible pour pouvoir tirer une conclusion sur ces résultats.

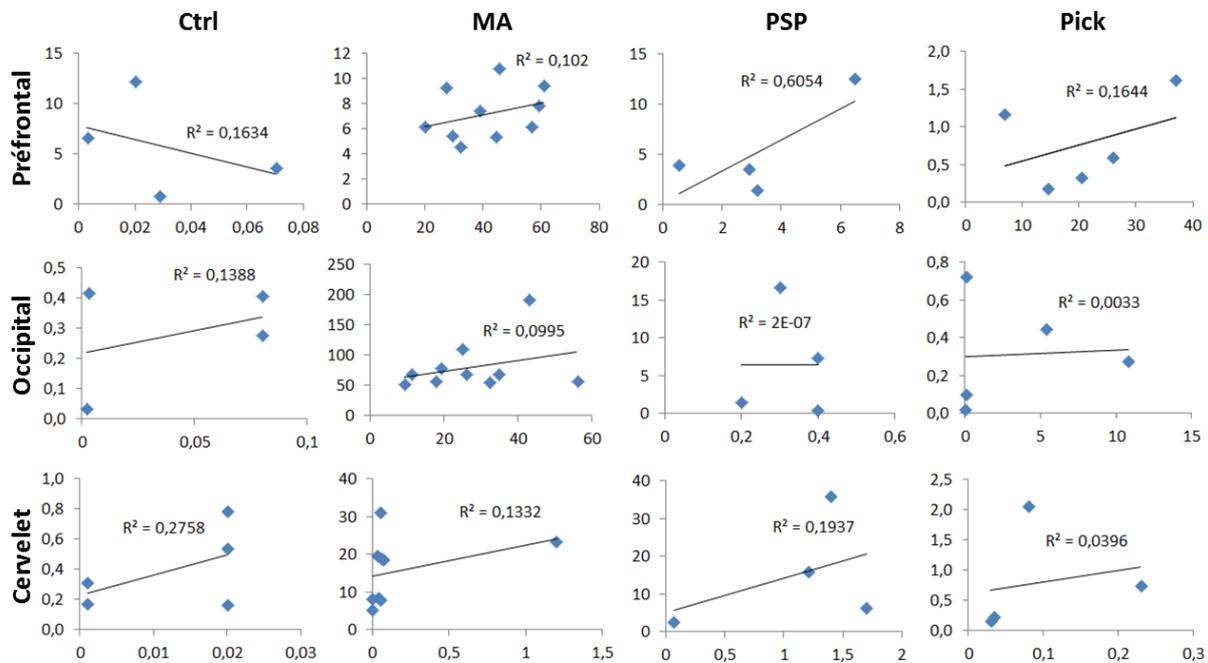
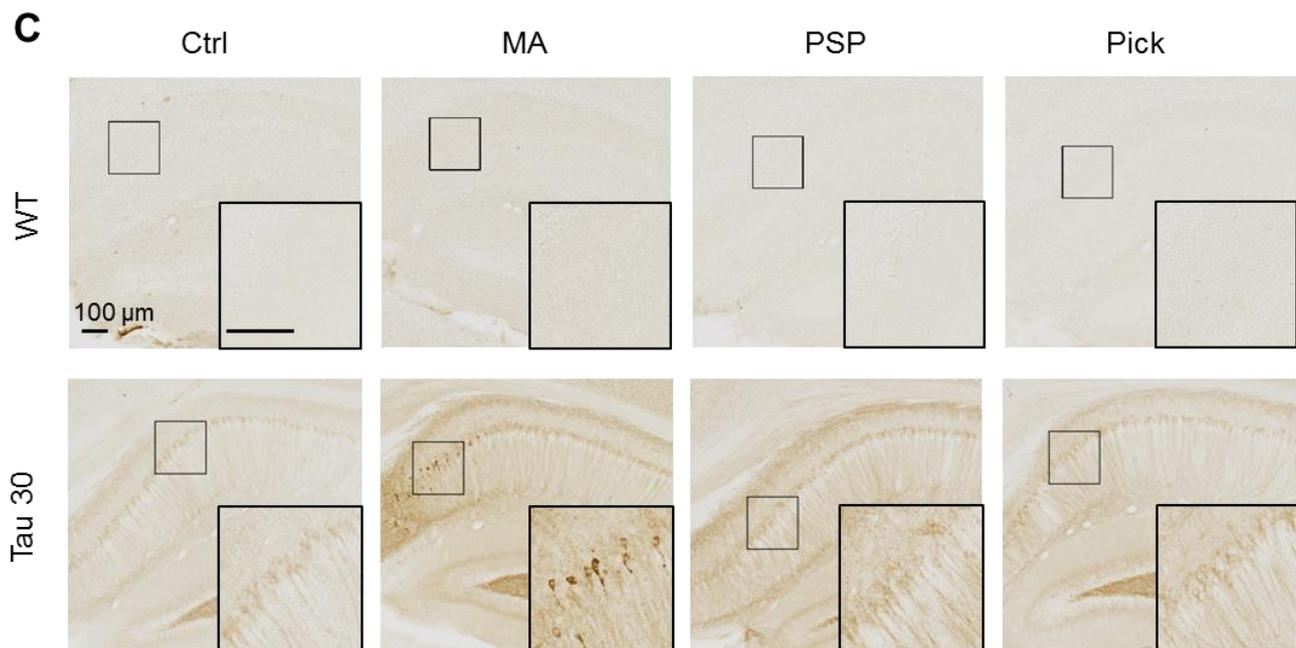
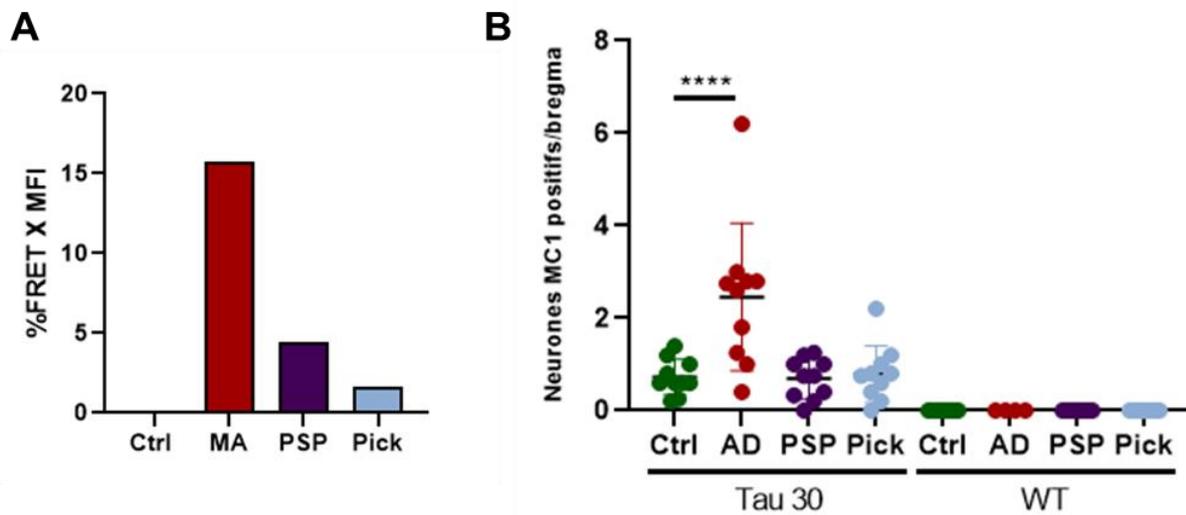


Figure 45 : Corrélation entre le signal FRET dans la fraction cellulaire du FC humain et la lésion tau dans chaque région et pour chaque groupe d'individus. Représentation graphique du signal obtenu en FRET (ordonné : %FRET x MFI) en fonction de la lésion tau (abscisse : % de lésions AT8 positives) pour chaque échantillon (Ctrl n=5, MA n=10, PSP n=5, Pick n=5). La droite de régression et le coefficient de détermination (R²) sont représentés.

2.5. Les VEs transportant des espèces pro-nucléantes sont capables de transmettre la pathologie tau *in vivo*

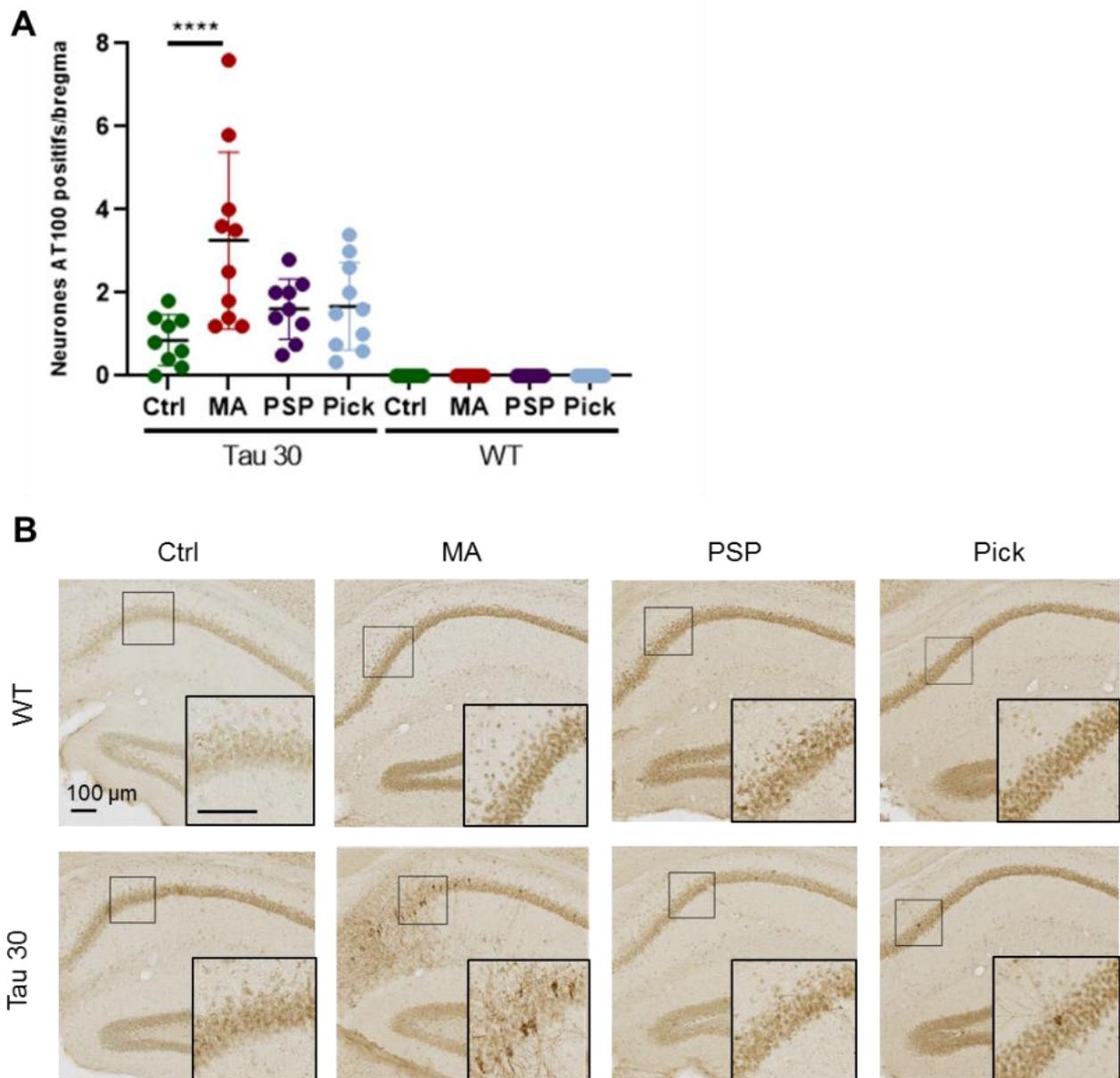
Afin de valider *in vivo* la présence d'espèces pro-nucléantes de tau capables de transmettre la pathologie dans les VEs humaines, ces dernières ont été injectées dans l'hippocampe de souris comme décrit précédemment (Albert et al., 2019). Les VEs de fluide cérébral préfrontal de 4 sujets contrôles, 4 patients MA, 4 patients PSP et 4 patients Pick (**tableau 6, en gras, Annexe page 203**) ont été regroupées. Leur capacité de nucléation a été évaluée dans le modèle FRET après transfection de 6×10^9 VEs (**figure 46, A**). Un signal FRET plus faible est observé pour les groupes PSP et Pick, comparativement au groupe MA, ce qui confirme les résultats précédents (**figure 42, A**). Elles ont ensuite été injectées bilatéralement (2 μ L contenant 6×10^9 VEs) dans les hippocampes de souris Tau30 et WT âgées de 1 mois. La pathologie tau étant très faible à 1 mois (**figure 37**), cela permet d'évaluer l'effet du matériel injecté. 1 mois après l'injection, les souris ont été sacrifiées. L'effet de l'injection des VEs sur le recrutement de la protéine tau humaine mutée endogène a été analysé par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps conformationnel MC1 (**figure 46**) et de l'anticorps phospho-dépendant

AT100 reconnaissant uniquement les formes insolubles ou agrégées (figure 47). L'immunoréactivité pour chaque anticorps a été quantifiée en aveugle sur 5 coupes d'hippocampe au niveau de la CA1. Elle révèle une absence de marquage chez les souris WT confirmant que les espèces présentes dans les VEs ne sont pas reconnues par les anticorps. Dans les souris Tau30, un marquage significatif pour les anticorps MC1 et AT100 est observé après injection des VEs de fluide cérébral de patients MA, mais pas de patients PSP et de patients Pick, comparativement aux sujets contrôles (figure 46 B et 47 A). Ces résultats montrent que les VEs contenant des espèces pro-nucléantes de tau, et notamment celles issues de patients MA, sont capables de potentialiser la pathologie tau *in vivo*. Ils suggèrent un recrutement et une conversion de la protéine tau humaine endogène en forme anormalement conformée et phosphorylée. Toutefois, il semblerait que cet effet soit dépendant de la concentration d'espèces pro-nucléantes disponibles ou de la tauopathie considérée, suggérant l'existence d'espèces pro-nucléantes différentes selon la tauopathie.



(figure page précédente)

Figure 46 : Les VEs cérébrales de patients MA entraînent un changement conformationnel de la protéine tau humaine endogène dans les souris transgéniques Tau30. (A) 2 μ L de VEs (6×10^9) issus de 2 mL de FC de 4 sujets Ctrl, 4 patients MA, 4 patients PSP et 4 patients Pick regroupés (tableau 6 en gras) ont été transfectés dans le modèle FRET. Le signal obtenu par cytométrie en flux est exprimé en pourcentage de signal FRET x intensité du signal (%FRET x MFI). (B) La même quantité de VEs a été injectée bilatéralement dans l'hippocampe de souris Tau30 (n=5) et WT (n=5) âgées de 1 mois. Les souris sont sacrifiées 1 mois après l'injection. Une quantification en aveugle de l'immunomarquage MC1 au niveau de la CA1 de l'hippocampe entre les bregmas de -2,3 et -2,8 (4/5 coupes) est réalisée. Les résultats représentent le nombre de corps cellulaires marqués par bregma analysé. Les données représentent les moyennes \pm écart-type. ANOVA suivi d'un test de Sidak ****p<0,0001. (C) Illustrations du marquage MC1 dans l'hippocampe au niveau du site d'injection. Pour chaque grossissement, la barre d'échelle représente 100 μ m.



(figure page précédente)

Figure 47 : Les VEs cérébrales de patients MA potentialisent la formation de lésions contenant des formes phosphorylées et agrégées de tau dans les souris transgéniques Tau30. (A) La même quantité de VEs a été injectée bilatéralement dans l'hippocampe de souris Tau30 (n=5) et WT (n=5) âgées de 1 mois. Les souris sont sacrifiées 1 mois après l'injection. Une quantification en aveugle de l'immunomarquage AT100 au niveau de la CA1 de l'hippocampe entre les bregmas de -2,3 et -2,8 (4/5 coupes) est réalisée. Les résultats représentent le nombre de corps cellulaires marqués par bregma analysé. Les données représentent les moyennes \pm écart-type. ANOVA suivi d'un test de Sidak ****p<0,0001. (B) Illustrations du marquage AT100 dans l'hippocampe au niveau du site d'injection. Pour chaque grossissement, la barre d'échelle représente 100 μ m.

2.6. Quelle est la place des espèces de tau non vésiculaire ?

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'effet des VEs. Toutefois, la présence d'espèces pro-nucléantes sous forme libre est décrite dans les fluides extracellulaires (Takeda et al., 2016). Il aurait donc été intéressant de comparer les deux voies de sécrétion de tau. Cependant, notre modèle ne semble pas être approprié pour faire cette comparaison. Il est décrit que la protéine tau est majoritairement sécrétée sous forme libre en comparaison aux formes vésiculaires (Dujardin, Bégard, et al., 2014; Y. Wang et al., 2017). Nous avons donc évalué la répartition de la protéine tau après purification du fluide cérébral de patients MA par SEC dans les fractions vésiculaires (1-4), mixtes (5-8) et libres (9-20) (figure 48, A et B) et dans chaque fraction individuelle (figure 48, C). Le profil inverse à celui décrit dans la littérature est observé avec plus de 90% de la protéine tau présente dans les VEs. Cela est probablement dû à une dégradation des protéines libres par l'action enzymatique de la papaïne tandis que celles présentes dans les VEs sont protégées de cette action. Le profil protéique obtenu par coloration à l'argent dans les fractions de SEC tend à confirmer cette hypothèse (figure 48, C).

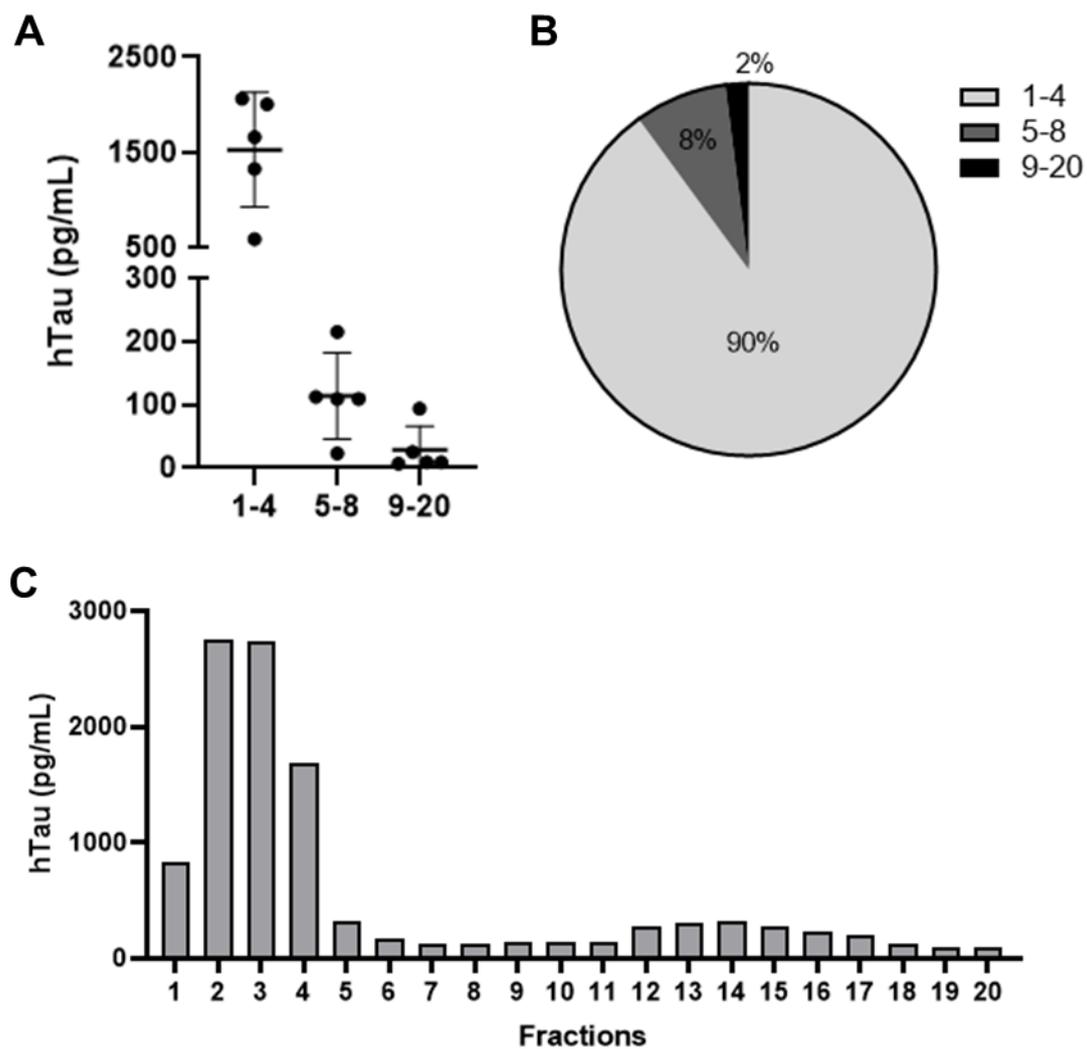


Figure 48 : Répartition de la protéine tau contenue dans le FC humain après purification par SEC. 500 μ L de FC occipital humain sont purifiés par SEC. (A) La concentration en protéines tau dans les fractions 1 à 4, 5 à 8 et 9 à 20 est évaluée par ELISA hTau (n=5 MA). (B) Pourcentage moyen de tau par fraction correspondant au dosage ELISA hTau. (C) Exemple de dosage de tau dans chaque fraction de SEC pour 500 μ L de FC préfrontal d'un patient MA (n=1).

2.7. Influence des peptides A β sur les capacités de nucléation des VEs

Compte tenu des données récentes sur les liens entre A β et tau dans la propagation de la pathologie tau (Bennett et al., 2017; Clayton et al., 2021; Gomes et al., 2019; He et al., 2018; Lam et al., 2021; G. A. Rodriguez et al., 2020), nous avons investigué cet aspect afin de déterminer si la présence des peptides A β au sein des VEs de patients MA pouvait contribuer à potentialiser l'effet de nucléation observé *in vitro* et *in vivo*. En effet, cela pourrait expliquer pourquoi la capacité de nucléation des VEs est plus élevée dans la MA que dans les autres tauopathies dans lesquelles les dépôts amyloïdes ne sont pas caractéristiques. Nous avons donc quantifié par ELISA la concentration des peptides A β 40 (figure 49, A) et A β 42 (figure 49, B) dans les VEs de fluide cérébral. Bien que la concentration d'A β 42 soit significativement supérieure dans les VEs de fluide cérébral préfrontal des patients MA comparativement aux sujets contrôles, ce peptide

est retrouvé dans toutes les tauopathies. Ces résultats préliminaires sont pour le moment difficiles à interpréter. Néanmoins, il semblerait que la présence de ces peptides dans les VEs cérébrales ne puisse pas expliquer la capacité de nucléation des VEs observée *in vitro* et *in vivo*.

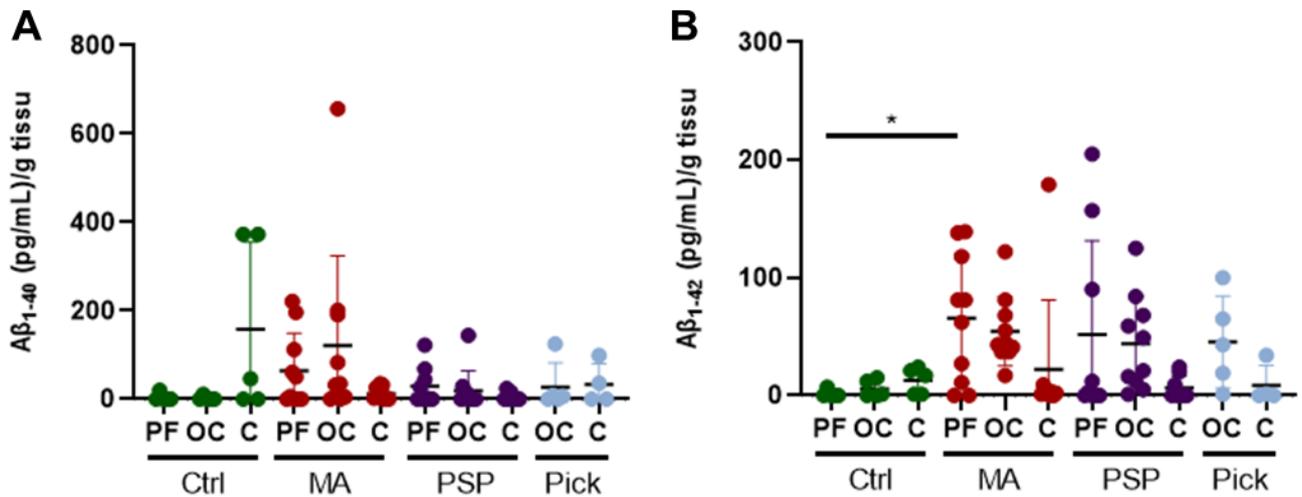
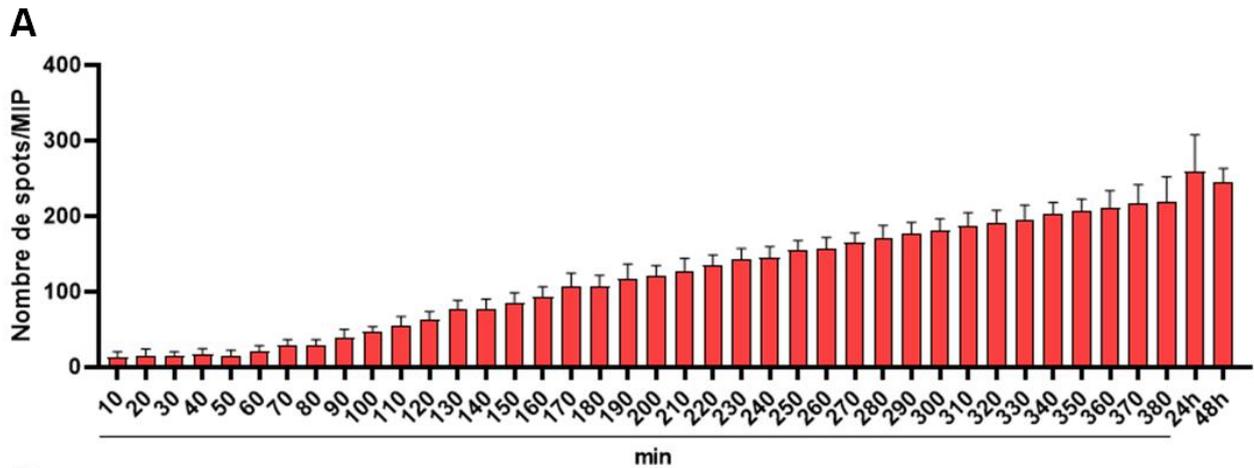


Figure 49 : Dosage des peptides Aβ dans les VEs de FC humain. Les peptides Aβ₄₀ (A) et Aβ₄₂ (B) ont été dosé par ELISA dans les VEs de FC humain (Ctrl n=5, MA n=10, PSP n=10, Pick n=5). Les données représentent les concentrations de chaque peptide en pg/mL normalisée au poids du tissu utilisé pour préparer le FC. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn : *p<0,05.

3. Internalisation neuronale de la protéine tau médiée par les VEs

La potentialisation de la pathologie tau dans l'hippocampe des souris Tau30 à la suite de à l'injection de VEs contenant des espèces pro-nucléantes, en l'absence de lipofectamine, soutend une internalisation neuronale de ces VEs. Elle n'est cependant pas démontrée. De ce fait, afin d'étudier les mécanismes permettant le transfert intercellulaire de la protéine tau via les VEs, nous avons tout d'abord voulu mettre ce dernier en évidence *in vitro*. Des VEs issues de fluide cérébral de souris KI-V5 ont été utilisées. Ces souris expriment la protéine tau humaine 1N4R mutée avec l'étiquette V5 sous le contrôle d'un promoteur murin permettant ainsi une expression physiologique de la protéine. Pour cette étude, c'est la présence de l'étiquette V5 qui nous intéresse. En effet, les cultures primaires neuronales de souris exprimant la protéine tau murine de façon endogène, il est nécessaire d'utiliser des anticorps anti-tau humain spécifique pour visualiser le transfert. Cependant, très peu sont disponibles. Nous pouvons donc utiliser des anticorps anti-V5 pour cibler directement l'étiquette présente au niveau de la protéine tau sécrétée dans les VEs.

L'internalisation des VEs par les neurones a tout d'abord été étudiée. Pour cela, les VEs sont marquées avec un colorant lipophile fluorescent (PKH26) qui nous permet d'analyser en temps réel leur accumulation au niveau neuronal grâce à un marqueur de lectines (WGA) (figure 50). Nous pouvons voir une augmentation de l'accumulation vésiculaire au cours du temps, jusqu'à 48h. Par la suite, l'utilisation de marqueurs membranaires est nécessaire pour déterminer si les VEs sont bien internalisées dans les neurones et dans quelle proportion.



B

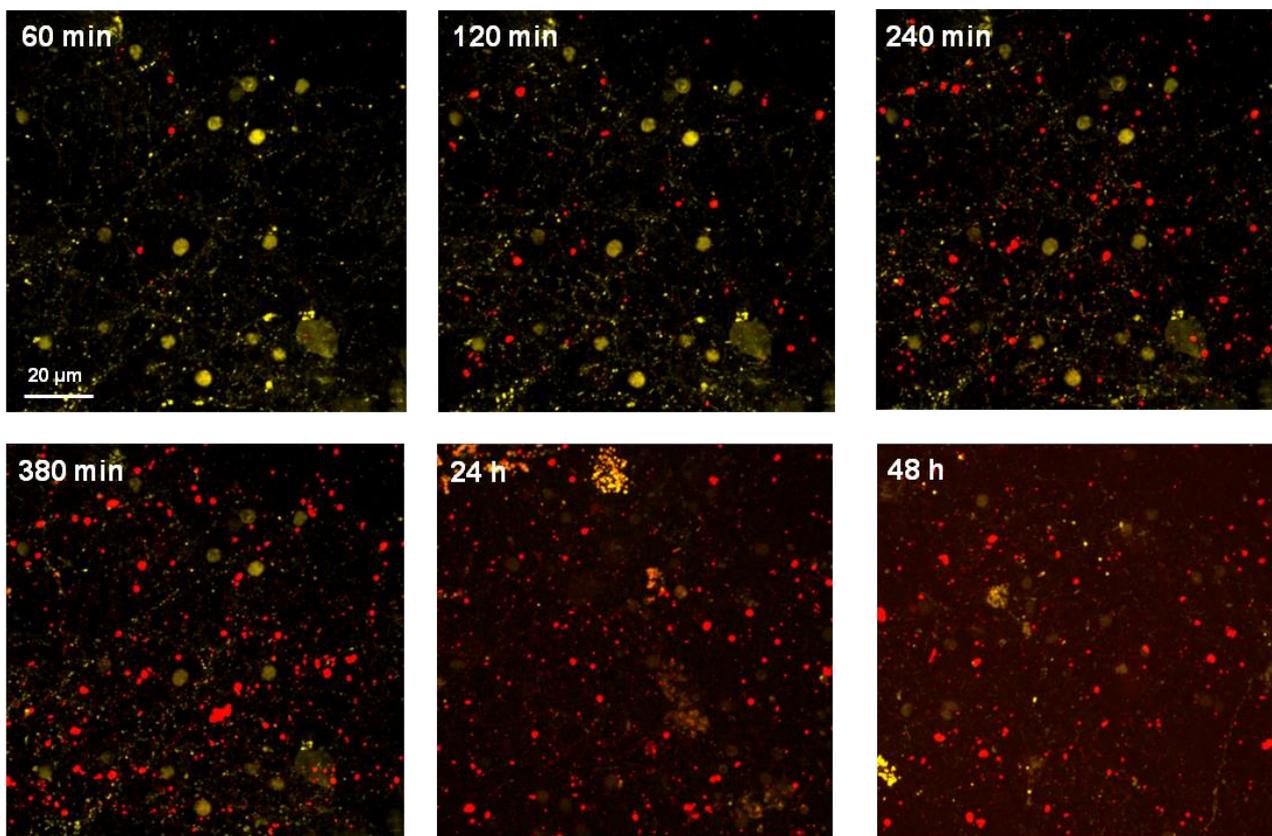


Figure 50 : Accumulation de VEs de FC murin dans des neurones primaires. Les lectines cellulaires ont été marquées avec une WGA. Le signal, représenté en jaune, est enregistré dans le rouge lointain à 647 nm. Il permet de visualiser facilement les cellules, encore vivantes au moment des acquisitions. Des VEs de FC de souris KI-V5 marquées avec un PKH26 (rouge, 568 nm) sont déposées dans le milieu de culture. Immédiatement après, des acquisitions dans 10 champs différents sont réalisées pendant 6 h toutes les 10 min. D'autres acquisitions avec les mêmes réglages sont réalisées à 24 h et 48 h. (A) Quantification sur Image J du nombre de spots rouges par champ (MIP = Maximal intensity projection) en fonction du temps. Les résultats représentent les moyennes \pm écart-types. (B) Illustration des MIP à différents temps pour un champ. N=1.

L'internalisation neuronale de la protéine tau contenues dans ces mêmes VEs a ensuite été investiguée. Après 6 h d'incubation avec les VEs, les cellules ont été rincées, fixées puis marquées avec un anticorps anti-V5 (**figure 51**). 50 nM de protéines tau solubles 1N4R-V5 recombinantes ont été utilisées comme contrôle positif de l'immunomarquage. Bien que les VEs déposées dans le milieu contiennent l'étiquette V5 (**figure 51, D**) et qu'elles semblent être internalisées à 6 h (**figure 50**), nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de cette étiquette dans les cellules que ce soit par immunofluorescence ou par ELISA (**figure 51, respectivement C et D**). La protéine tau recombinante a quant à elle bien été internalisée par les neurones. Il est intéressant de noter que les VEs contiennent 3 ng/mL de protéine tau-V5. Ici, 16 milliards de VEs contenues dans 20 μ L de PBS ont été ajoutés au milieu, soit l'équivalent de 1,25 nM de tau-V5, à savoir 40 fois moins que pour la protéine tau-V5 recombinante (50 nM). Un manque de sensibilité des techniques d'immunofluorescence et d'ELISA pourrait donc expliquer l'absence de la visualisation de l'internalisation neuronale de tau via les VEs dans notre modèle de CP de neurones.

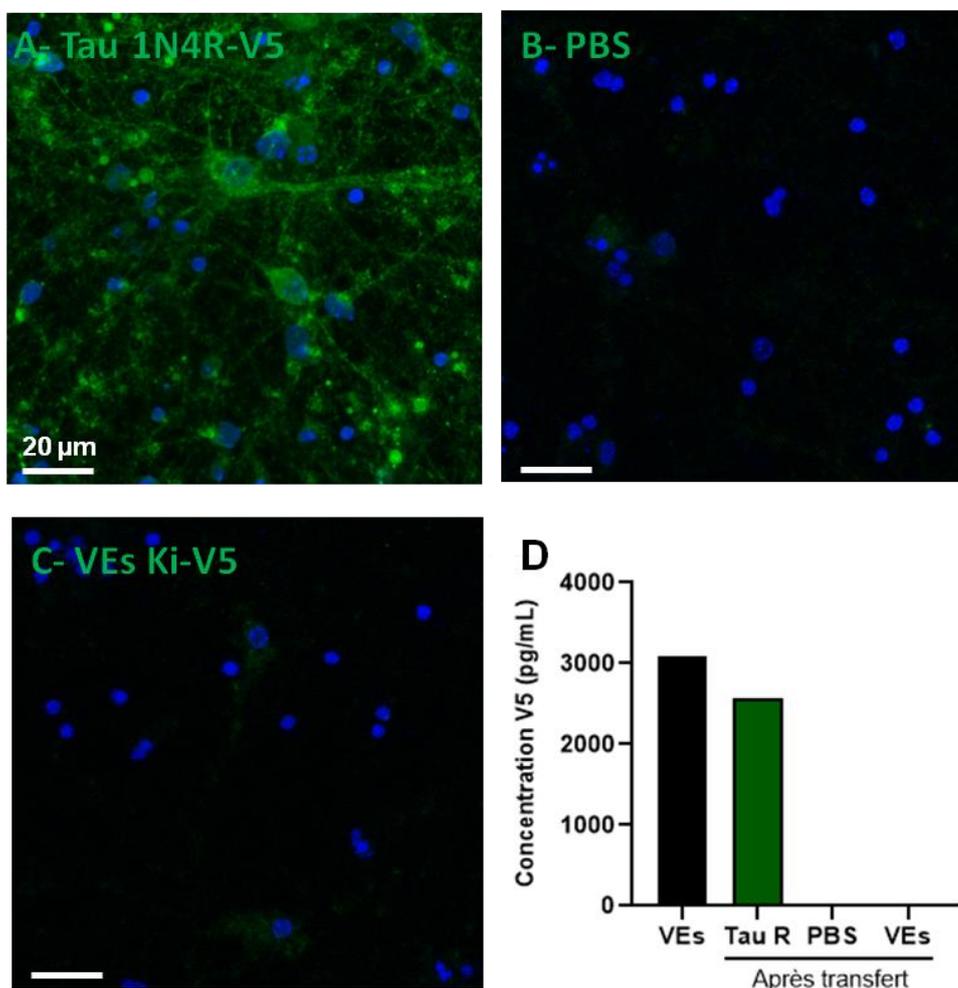


Figure 51 : Internalisation neuronale de la protéine tau via des VEs de FC murin. $1,6 \times 10^{10}$ VEs de FC de souris KI-V5 ont été déposées dans le milieu de 300 000 neurones primaires à DIV 25. 50 nM de protéines tau solubles 1N4R-V5 recombinantes ont été utilisés comme contrôle positif. Du PBS a été utilisé comme contrôle négatif. 6 h après l'ajout dans le milieu, les cellules ont été rincées puis fixées. Un immunomarquage anti-V5 avec système d'amplification du signal a été réalisé. (A-C) Photos acquises par microscopie confocale (*maximal intensity projection*). V5 = vert, 488 nm. DAPI (noyaux) = bleu, 450 nm. (D) Dosage de la protéine tau-V5 par ELISA anti-V5 dans la fraction VEs déposée dans le milieu et dans les lysats cellulaires après 6 h de transfert pour les 3 conditions. N = 1.

Discussion - Conclusion

Dans cette étude, nous avons étudié le rôle des VEs cérébrales comme actrices de la propagation de type prion de la pathologie tau et de l'hétérogénéité entre les tauopathies. À ce jour, la plupart des études ont investigué le rôle des VEs dans des modèles cellulaires ou animaux (Baker et al., 2016; Pérez et al., 2019; Polanco et al., 2016, 2018, 2021; Winston, Aulston, et al., 2019; Winston, Romero, et al., 2019) mais peu de données sont disponibles pour l'Homme (Ruan et al., 2021). L'ISF est le fluide extracellulaire directement en contact avec les cellules cérébrales ; il est donc particulièrement intéressant pour l'étude des voies de sécrétion de la protéine tau et leur implication dans la propagation de la pathologie. Une étude récente a montré pour la première fois que les VEs isolées à partir de fluide cérébral de patients MA contiennent des espèces pro-nucléantes de tau capables d'induire une pathologie tau chez des souris sauvages âgées (Ruan et al., 2021). En revanche, les formes oligomériques et fibrillaires de tau issues des mêmes patients n'ont pas eu cet effet *in vivo* (Ruan et al., 2021). Nous confirmons ici ces données et avons étendu notre étude à d'autres tauopathies et à plusieurs régions cérébrales, affectées différemment par la pathologie, afin de mieux comprendre l'hétérogénéité clinique et lésionnelle observée entre les patients MA, PSP et Pick.

À l'aide d'un modèle transgénique murin de tauopathie, nous avons pu (1) contrôler la qualité de nos préparations vésiculaires, (2) démontrer la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs cérébrales et, (3) mettre en évidence un lien entre la capacité de nucléation des VEs et la sévérité de la pathologie tau. Nous avons confirmé ces résultats chez l'Homme dans des régions cérébrales différemment affectées par la pathologie. Nos données montrent clairement la présence d'espèces pro-nucléantes associées aux VEs de patients MA alors qu'elles semblent moins abondantes dans la PSP et dans Pick. Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons, à commencer par le fait que la pathologie tau est moins importante dans la PSP et dans Pick. Cependant, il est également possible que la propagation, si elle existe, puisse se faire par d'autres voies que via les VEs. Malheureusement, du fait de la dégradation des protéines extravésiculaires dans le fluide cérébral, nous n'avons pas pu étudier ces aspects. Il est également possible que le modèle cellulaire FRET ne soit pas adapté pour quantifier la nucléation dans la PSP et dans Pick. Des études ont notamment montré que des lysats de cerveaux PSP donnent un signal FRET très hétérogène selon les patients (Sanders et al., 2014). De plus, la maladie de Pick est une tauopathie où les isoformes 3R de tau s'agrègent alors que dans le modèle FRET, les 4 domaines de répétitions de tau sont présents. D'ailleurs, le seul patient pour lequel nous avons observé un signal FRET important est celui qui présente des DNF en plus des corps de Pick. Une étude a d'ailleurs montré dans des cultures cellulaires que des extraits de cerveaux Pick sont capables d'entraîner le recrutement de la protéine tau endogène uniquement lorsque les isoformes 3R sont exprimés dans ces cellules (Woerman et al., 2016), bien que dans le modèle que nous utilisons, un signal FRET a été rapporté pour les lysats de cerveaux Pick (Sanders et al., 2014). Néanmoins, ce modèle FRET n'est peut-être pas pertinent pour l'étude de toutes les tauopathies.

Quoi qu'il en soit, ces données pointent du doigt une nouvelle fois l'hétérogénéité qui existe entre les différentes tauopathies. Rappelons que la maladie de Pick est une DFT sporadique 3R (Forrest et al., 2018) difficilement différentiable d'une FTDP-17. Dans les deux cas, des corps de Pick sont observés, même si dans les FTDP-17, ils sont phosphorylés en sérine 262 (Chaunu et al., 2013; Delacourte et al., 1998; Mailliot et al., 1998). Dans tous les cas, ces lésions semblent

particulièrement agressives car la maladie de Pick touche souvent des personnes relativement jeunes (≈ 50 ans) et se caractérise par une atrophie fronto-temporale sévère liée à la mort neuronale. Les corps de Pick se trouvent principalement dans les couches II et VI de l'isocortex fronto-temporal et dans la couche granulaire du gyrus denté (Buée et al., 2000; Hof et al., 1994). Ces cellules expriment principalement les isoformes 3R de tau. Cela suggère qu'elles sont particulièrement fragiles (Mrdjen et al., 2019; Richetin et al., 2020) ou bien que la pathologie 3R est plus nocive que propagatrice (Dujardin et al., 2018; Sealey et al., 2017; C. Xu et al., 2020). Nos données montrent en effet la présence d'espèces pro-nucléantes dans la fraction cellulaire et vésiculaire du fluide cérébral uniquement dans le cortex préfrontal, alors qu'un marquage AT8 est présent dans le cortex occipital (sans corps de Pick apparents). Cela va dans le sens d'une pathologie plutôt focale se propageant peu. Dans la PSP, où les isoformes 4R de tau s'agrègent, des lésions sont présentes aussi bien dans les neurones que les cellules gliales (Dickson, 1999; Hauw et al., 1990; T. Yamada et al., 1992). Dans notre étude, la présence d'espèces pro-nucléantes dans les fractions cellulaire et vésiculaire reflète assez bien l'intensité des lésions, bien qu'une corrélation soit difficile à établir du fait du nombre limité d'individus inclus et de l'hétérogénéité entre ces individus. Toutefois, l'origine des VEs contenant ces espèces (neuronales ou gliales) reste à déterminer. Enfin, dans la MA, les isoformes 3R et 4R s'agrègent et les lésions progressent de façon stéréotypée jusqu'à l'ensemble du cortex (Braak & Braak, 1991). Le cervelet reste quant à lui épargné. Pourtant, nous avons identifié des VEs contenant des espèces pro-nucléantes de tau dans le cervelet dépourvu de lésions (marquage AT8). Cela suggère que les VEs circuleraient à travers tout le cerveau et que les récepteurs et les ligands présents aux niveaux cellulaire et vésiculaire pourraient expliquer la vulnérabilité de certaines cellules face à l'arrivée de ces VEs pathologiques. Cependant, il est intéressant de remarquer que dans la fraction cellulaire, des espèces pro-nucléantes sont détectées dans le cervelet, bien que le signal ne soit pas significativement différent du groupe contrôle ($p=0,13$). Il est possible qu'en augmentant le nombre d'échantillons, nous atteignons le seuil de significativité statistique ($p<0,05$). Cette observation a toutefois été confirmée par une autre étude (Furman et al., 2017). De plus, l'activité de nucléation a été décrite comme précédant les autres marqueurs de la pathologie tau comme AT8 dans des modèles animaux de tauopathies (Holmes et al., 2014; Kaufman et al., 2017). Il est donc possible que les espèces pro-nucléantes détectées dans les VEs du cervelet soient sécrétées par les cellules du cervelet elles-mêmes, d'autant plus que nous ne savons pas comment circule l'ISF entre le cerveau et le cervelet. Dans une étude sur les flux d'ISF dans le cerveau du rat, l'utilisation de traceurs couplée à des techniques d'imagerie a permis de montrer que l'ISF tracé au niveau du noyau caudé s'écoule vers le cortex ipsilatéral et est drainé dans l'espace sous-arachnoïdien en deux heures (Han et al., 2012, 2014). Même si le thalamus est situé à côté du noyau caudé, l'ISF tracé ne l'atteint pas. Quant à l'ISF tracé à partir du thalamus, il n'atteint pas non plus le noyau caudé (Han et al., 2014; Zuo et al., 2015). Cette observation invite à penser que l'ISF ne circule pas à l'échelle du cerveau entier mais se limite à certaines régions. Néanmoins, le cervelet reste une région plutôt préservée car nous avons analysé des cerveaux aux derniers stades de progression de la pathologie (Braak V et IV). Nous pouvons imaginer que si les patients avaient vécu plus longtemps, la pathologie tau aurait fini par se développer dans le cervelet. Toutefois, à l'inverse des cellules vulnérables face à la pathologie tau, celles du cervelet semblent plutôt résistantes (Fu et al., 2018; Mrdjen et al., 2019). Une étude a notamment mis en évidence, dans ces cellules, des différences d'expression de protéines impliquées dans la survie neuronale et la réponse au stress oxydant et à l'inflammation entre des patients MA et des sujets contrôles du même âge (J. Xu et al., 2019). Cela suggère des réponses adaptatives de ces cellules pour se protéger de la pathologie.

Plusieurs hypothèses sont alors possibles pour expliquer la résistance à la pathologie du cervelet : (1) les VEs contenant les espèces pro-nucléantes ne sont pas internalisées par les neurones du fait de l'absence d'un couplage ligand/récepteur affin, (2) les neurones qui reçoivent les espèces pro-nucléantes disposent de mécanismes de défense performants, comme par exemple des systèmes de dégradation plus efficaces que dans d'autres régions du cerveau, (3) les VEs sont internalisées dans des cellules gliales capables de prendre en charge la dégradation des espèces pro-nucléantes. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour démêler les mécanismes impliqués dans la vulnérabilité cellulaire associée aux tauopathies.

De plus, nous avons montré que la concentration vésiculaire et la concentration protéique de tau dans les VEs cérébrales humaines ne diffèrent pas significativement entre les régions et les tauopathies. Une étude récente confirme l'absence de différence de sécrétion vésiculaire globale entre des VEs de fluide cérébral de sujets contrôles et de patients MA (Muraoka et al., 2020). Cependant, il est important de rappeler que les VEs du fluide cérébral étudiées ici regroupent les VEs libérées par tous les types cellulaires. Prises individuellement, il est donc possible que la sécrétion vésiculaire neuronale, par exemple, soit impactée par la pathologie. Concernant la sécrétion de tau, une étude montre une diminution de la quantité de protéines tau dans l'ISF avec l'évolution de la pathologie dans plusieurs modèles de souris transgéniques (Barini et al., 2021). Toutefois, il faut noter que ce n'est pas la forme vésiculaire qui est étudiée. Ici, l'absence de différence de sécrétion de la protéine tau dans les VEs entre les contrôles et les patients souligne sa sécrétion physiologique, bien que sa fonction ne soit pas encore comprise. Il est toutefois important de souligner l'hétérogénéité entre nos valeurs (concentration VEs, protéine tau et signal FRET), ce qui soutient l'existence d'une hétérogénéité intra-tauopathie importante. Une étude a notamment corrélé l'évolution clinique de la MA avec la concentration d'espèces pro-nucléantes dans le cerveau (Dujardin et al., 2020). Bien que nous n'ayons pas accès à ces données, cela pourrait expliquer en partie l'hétérogénéité que nous observons. Nous n'avons pas non plus pris en considération les différents phénotypes cliniques qu'il est possible de retrouver dans la MA et la PSP notamment. De plus, nous avons également évoqué le cas du patient avec des corps de Pick et des DNF mais il existe beaucoup d'autres co-morbidités qui peuvent être présentes simultanément dans le cerveau des patients (**figure 10 page 18**). Elles ne sont malheureusement pas non plus prises en compte mais pourraient contribuer à expliquer l'hétérogénéité inter-individuelle intra- et inter-tauopathies. En effet, nos travaux sont focalisés sur la protéine tau mais elle n'est pas le seul facteur à considérer. Dans la MA par exemple, des dépôts amyloïdes sont également caractéristiques. Plusieurs études montrent une potentialisation de la pathologie tau en présence de lésions β -amyloïdes (Bennett et al., 2017; Clayton et al., 2021; Gomes et al., 2019; He et al., 2018; Lam et al., 2021; G. A. Rodriguez et al., 2020). Les dosages des peptides A β 40 et A β 42 dans les VEs cérébrales vont dans le même sens que ceux déjà publiés (Muraoka et al., 2020). Pourtant, ils ne nous permettent pas d'expliquer les résultats obtenus dans le modèle FRET. La sécrétion vésiculaire des peptides A β étant physiologique (Brothers et al., 2018), elle n'est pas forcément impliquée dans les processus de propagation de la pathologie. De nombreux autres facteurs pourraient également expliquer l'hétérogénéité entre les patients (neuroinflammation, génotype APOE, qualité du sommeil, épilepsie, maladies cardio-vasculaires, etc.) mais toutes ces informations ne sont pas disponibles. Ils reflètent néanmoins la complexité et la diversité des événements physiopathologiques qui conduisent à une pathologie propre à chaque individu.

Au-delà des données obtenues *in vitro*, les résultats de ce projet ont également permis de confirmer *in vivo* la bioactivité des espèces pro-nucléantes présentes dans les VEs cérébrales de patients MA. Celles issues des patients PSP et Pick n'ont pas permis d'observer une potentialisation de la pathologie tau chez les souris Tau30. Toutefois, il est important de souligner que la quantité d'espèces pro-nucléantes injectée était aussi plus faible que pour la MA. Les VEs cérébrales de patients MA, quant à elles, ont permis de potentialiser la pathologie ce qui sous-tend une internalisation des espèces pro-nucléantes présentes dans les VEs ainsi qu'un recrutement de la protéine tau humaine mutée endogène par ces espèces. Toutefois, cela n'a pas été clairement démontré. Pour mieux comprendre les mécanismes d'internalisation neuronale des VEs issues du fluide cérébral, nous avons utilisé un modèle de culture primaire de neurones murins. Cependant, nos données sont encore préliminaires et n'ont pas permis de mettre en évidence l'internalisation de tau dans les neurones via les VEs. Les techniques utilisées pour visualiser cette internalisation ne sont probablement pas assez sensibles compte-tenu des concentrations en protéines tau disponibles initialement dans les VEs. Dans d'autres modèles ou conditions expérimentales, l'internalisation de la protéine tau médiée par les VEs a été démontré par ELISA et par immunofluorescence (Ruan et al., 2021; Y. Wang et al., 2017). *In vitro*, nous avons utilisé de la lipofectamine afin de garantir l'entrée du matériel dans le modèle cellulaire de FRET, comme dans d'autres études (Polanco et al., 2016; Ruan et al., 2021). Sans son utilisation, il semblerait que les VEs ne soient pas internalisées par les cellules HEK 293T, probablement du fait de l'absence d'un couplage ligand/récepteur aboutissant à leur endocytose. Il est également possible que les VEs soient internalisées mais que leur contenu soit ensuite dégradé par la cellule. Dans plusieurs études, il a été montré qu'une fuite des compartiments endolysosomiaux des espèces pro-nucléantes améliore la propagation de la pathologie tau, probablement en rendant ces espèces disponibles dans le cytosol des cellules (J. J. Chen et al., 2019; Polanco et al., 2018, 2021). Or, la lipofectamine induit ce type de dommages (J. J. Chen et al., 2019). Son utilisation pourrait donc permettre de rendre le contenu des VEs internalisées disponible dans le cytosol des cellules HEK 293T.

Enfin, certaines limites sont à garder en tête quant aux conclusions de ces travaux. Tout d'abord, la préparation du fluide cérébral nécessite l'utilisation de papaïne, entraînant une protéolyse de notre préparation. Il est donc fortement possible que les cellules soient endommagées et libèrent alors une partie de leur contenu dans ce fluide. Ce dernier ne reflète donc pas totalement le contenu de l'ISF. Toutefois, la présence de vésicules intactes a tout de même été confirmée, ce qui permet de les étudier. En revanche, rien ne permet d'être certain que ces vésicules soient bien des vésicules extracellulaires sécrétées activement par les cellules. En effet, certaines d'entre elles pourraient être des vésicules intracellulaires ou des endosomes destinés à la dégradation. Le terme « VEs » que nous utilisons n'est donc pas forcément le plus adapté. De plus, *in vivo*, nous avons montré que les espèces pro-nucléantes détectées *in vitro* ont un effet biologique dans un organisme intégré mais nous n'avons pas montré une propagation de la pathologie au-delà du site d'injection. Nous utilisons également des souris transgéniques qui expriment une forme mutée de la protéine tau humaine, pro-agrégative. Nous ne montrons donc pas un recrutement de protéine endogène normal comme c'est le cas dans les tauopathies sporadiques (MA, PSP, Pick). Bien que notre étude s'inscrive dans l'hypothèse d'une propagation de type prion de la pathologie tau, nous ne fournissons pas toutes les évidences pour confirmer les similitudes entre la protéine tau et la protéine prion PrPSc bien que nos données aillent dans ce sens.

4. Quelles VEs sont impliquées dans la propagation ? Séparation de sous-types vésiculaires basée sur la taille

En lien avec les données présentées précédemment, le troisième objectif de ce projet de thèse est de chercher à isoler différentes populations vésiculaires afin de comprendre leur rôle respectif dans le transport d'espèces pro-nucléantes et la propagation de la pathologie tau. L'idée est de décrypter la signature protéique et l'origine des VEs impliquées dans la propagation de la pathologie tau afin de proposer une cible thérapeutique les neutralisant. Pour cela, nous avons mis au point un protocole permettant la séparation de deux sous-populations vésiculaires en fonction de la taille. Du fait du manque de marqueurs spécifiques et de la difficulté à connaître leurs origines une fois sécrétée, il est convenu par la communauté scientifique de parler de petites VEs (p-VEs) et de grandes VEs (g-VEs) et non plus d'exosomes et de microparticules. Ces termes sont donc employés dans cette sous-partie. L'analyse protéomique réalisée après la séparation des p-VEs et des g-VEs a notamment pour but d'identifier des marqueurs spécifiques à ces sous-populations.

Le protocole classique de SEC ne permettant pas de séparer les p-VEs des g-VEs, nous avons combinés plusieurs techniques d'isolement. Les mises au point ont d'abord été réalisées sur du milieu conditionné de culture primaire (CP) de neurones, moins précieux et plus facilement accessible que le fluide cérébral (FC) humain. Le protocole est rappelé sur la **figure 52, A**. La première étape de SEC nous sert à éliminer les contaminants protéiques des VEs. Les étapes d'ultracentrifugation suivantes nous permettent de culoter les g-VEs et ainsi récupérer les p-VEs dans le surnageant. L'avantage de réaliser des ultracentrifugations à 15 000 g maximum est que les g-VEs ne s'agrègent pas (**figure 52, F**). La concentration vésiculaire dans les différentes fractions (n=3) est représentée sur la **figure 52, C et D**. Dans la fraction p-VEs, la majorité des VEs se distribuent autour d'un pic à 90 nm alors que dans la fraction g-VEs, le pic est décalé vers 180 nm. Il est important de noter que dans la fraction mixte (m-VEs), nous récupérons aussi bien des p-VEs que des g-VEs qui ne seront pas analysées par la suite. Une pureté de 100 % des fractions p-VEs et g-VEs est impossible à obtenir techniquement. C'est pourquoi nous avons quantifié le recouvrement en taille entre les fractions. Le pourcentage de VEs inférieures et supérieures à 100 nm a été évalué par NTA (**figure 52, B**) et par microscopie électronique (**figure 52, E**). Cela nous permet de confirmer par deux techniques différentes l'enrichissement de petites et de grandes VEs, respectivement dans les fractions p-VEs et g-VEs.

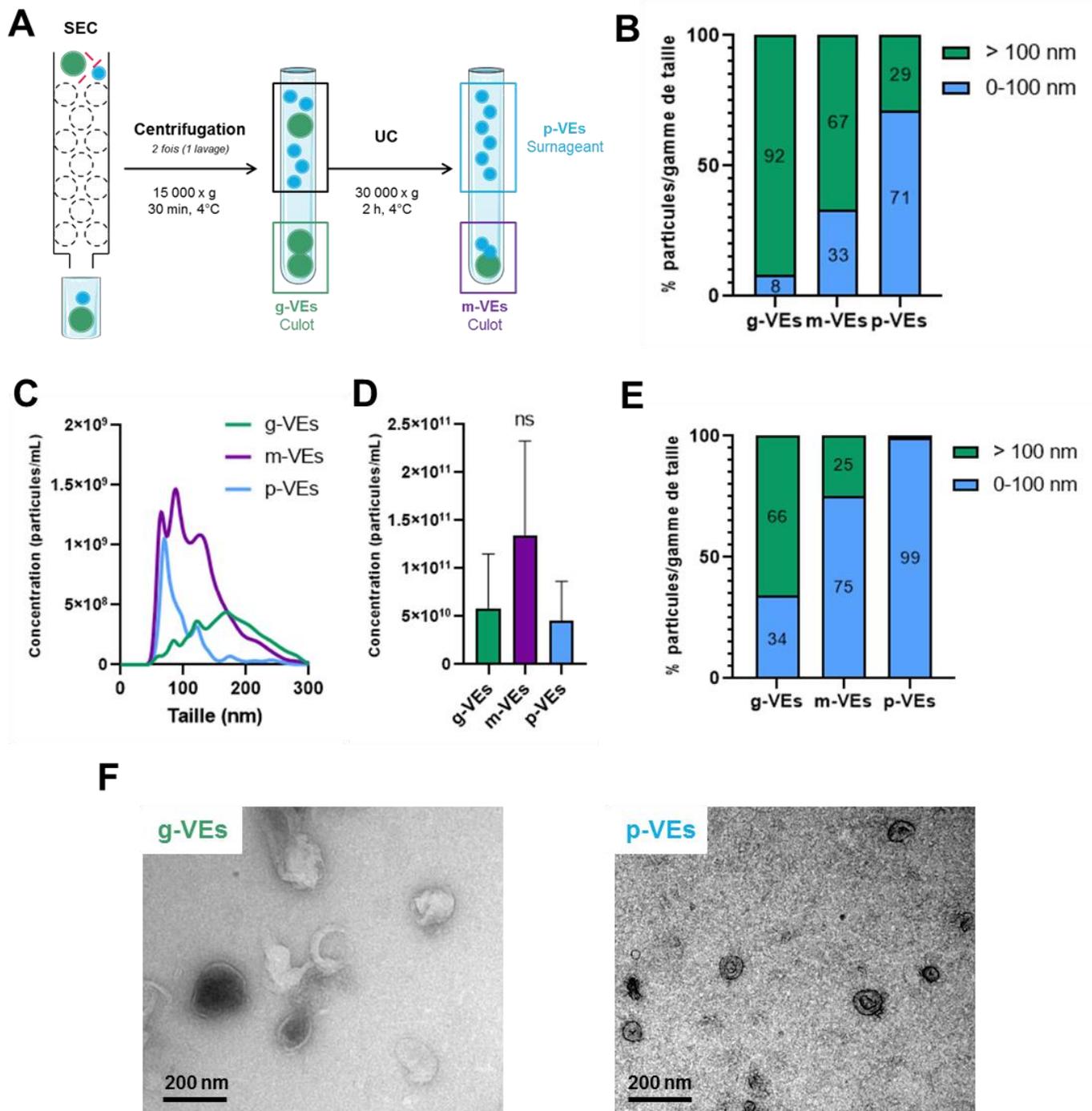
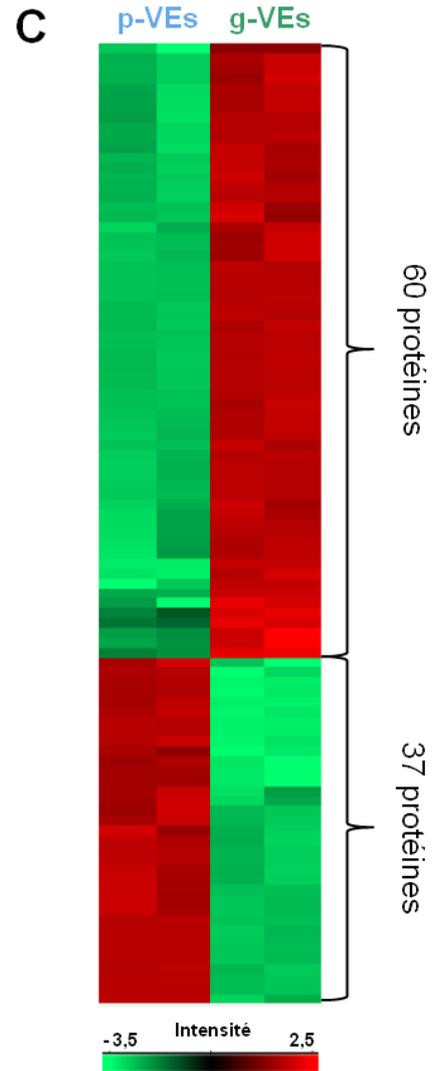
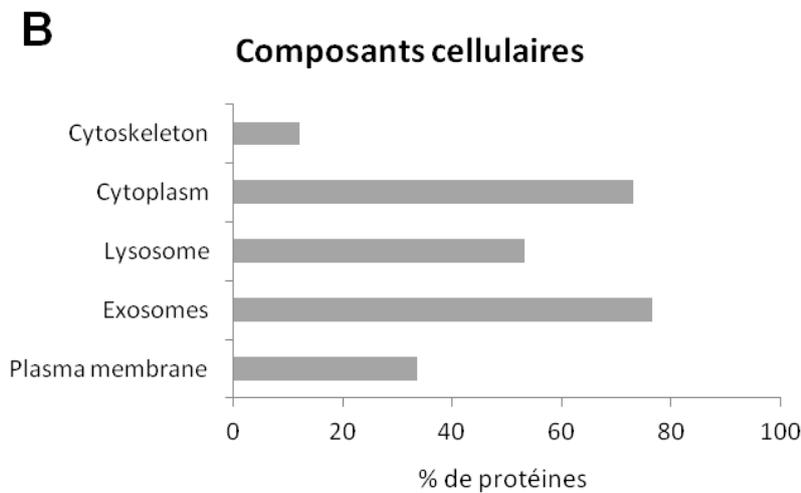
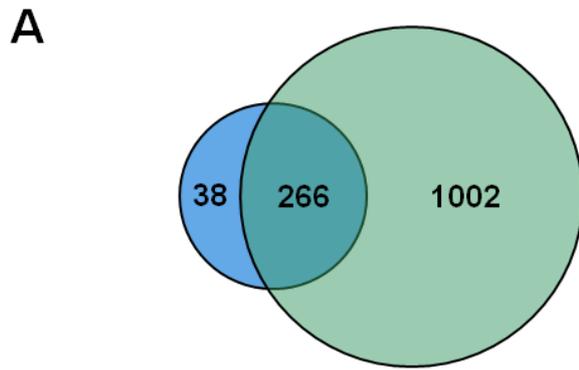


Figure 52 : Optimisation de la séparation des grandes et des petites VEs sécrétées par des neurones primaires corticaux de souris. (A) Protocole d'isolement des VEs à partir de milieu de neurones primaires à DIV 20. (B) Répartition en taille moyenne des VEs dans chaque fraction obtenue au NTA. (C) Concentration vésiculaire en fonction de la taille. (D) Concentration vésiculaire totale. (E) Répartition en taille moyenne des VEs dans chaque fraction après quantification des photos de microscopie électronique. (F) Photos de microscopie électronique de la fraction g-VEs et p-VEs. N=3 cultures primaires indépendantes. Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$, ns : non significatif.

À la suite de l'optimisation de la séparation des p-VEs et g-VEs, nous avons analysé par spectrométrie de masse, en collaboration avec le Pr. Christophe Lefebvre de l'équipe PRISM à Lille, les fractions p-VEs et g-VEs dans le but (1) de valider la présence de deux populations distinctes et (2) d'identifier des marqueurs spécifiques à chacune d'entre elles. La même quantité de VEs pour chaque fraction a été analysée. Le diagramme de Venn (**figure 53, A**) représente le nombre de protéines identifiées dans chaque fraction. Nous retrouvons plus de 1200 protéines dans les g-VEs contre tout juste 300 pour les p-VEs ce qui signifie que les g-VEs transportent plus de protéines que les p-VEs. Cela crée un biais dans l'analyse des données. En effet, nous ne pouvons pas chercher à identifier un marqueur spécifique dans 38 protéines contre 1002 car il est possible qu'une protéine identifiée dans les g-VEs ne le soit pas dans les p-VEs en raison de sa plus faible concentration et son absence de détection par la technique. À l'avenir, la normalisation devra donc se faire à une quantité de protéines et non plus à une quantité de VEs, afin de pouvoir comparer les différents groupes. Une analyse des termes *Gene Ontology* pour les composants cellulaires (GOCC) des 266 protéines communes aux deux groupes met en évidence une majorité de protéines associées aux exosomes et à la membrane plasmique (**figure 53, B**), ce qui permet de confirmer la présence de VEs par protéomique. Parmi les protéines identifiées, nous retrouvons des protéines décrites comme étant associées aux VEs comme par exemple TSG101, CD81, CD47, ADAM10, LAMP 1 et 2, flotiline-2, tau, ARF6, Rab (5c, 10, 7) ou encore HSP90 (Lo Cicero et al., 2015; Théry et al., 2018). Toujours parmi les protéines communes aux deux groupes, 97 se trouvent significativement sur- ou sous-exprimées par rapport à l'autre groupe. Cela suggère l'existence d'une signature moléculaire spécifique à chaque population. Lors des futures analyses avec une normalisation à la concentration protéique, il serait intéressant de confirmer ce profil pour comprendre sa signification. Quoiqu'il en soit, ces premières analyses tendent à confirmer que nous avons bien isolé deux sous-populations vésiculaires distinctes, au-delà du simple critère de taille. Il semble donc pertinent d'appliquer ce protocole au fluide cérébral humain afin d'étudier plus en détails les VEs impliquées dans la propagation de la pathologie tau.

(figure page suivante)

Figure 53 : Analyse protéomique des petites et des grandes VEs sécrétées par des neurones primaires corticaux de souris. (A) Diagramme de Venn des protéines identifiées dans les petites VEs (bleu) et dans les grandes VEs (vert). Le croisement entre les deux cercles représente le nombre de protéines communes aux deux groupes vésiculaires. (B) Pourcentage des protéines communes aux deux groupes pour le *GO terms Cellular Component* dans le logiciel FunRich. (C) Heat-map des protéines significativement sur-exprimées (rouge) ou sous-exprimées (vert) en fonction du sous-groupe vésiculaire. T-test avec $p < 0,01$ pour 97 protéines. Les peptides digérés à partir de 5×10^{10} VEs issues de 3 cultures primaires indépendantes ont été analysés par spectromètre de masse NanoLC-MS/MS en duplicat.



Le protocole développé pour le milieu conditionné de cultures primaires a donc été appliqué au fluide cérébral humain dans le but de mieux comprendre quelles sont les VEs qui transportent les espèces pro-nucléantes de tau et d'identifier des marqueurs spécifiques à ces VEs. Dans cette partie, nous avons travaillé uniquement sur du fluide cérébral préfrontal de sujets contrôles et de patients MA. Le protocole développé pour les CP a été légèrement adapté à ce fluide ([voir section matériels et méthodes, I-4.2.3, figure 30](#)). En effet, il est important de souligner que selon le fluide étudié, les VEs sécrétées diffèrent et la puissance de l'ultracentrifugation pour culoter les g-VEs doit être adaptée. De la même façon que pour les CP, les différentes fractions vésiculaires ont été caractérisées. La distribution en fonction de la taille et la concentration vésiculaire (n=3) sont représentées sur la [figure 54, A et B](#). Contrairement aux VEs de CP, dans le fluide cérébral, la concentration des p-VEs est significativement supérieure à celle des g-VEs. Cela souligne une nouvelle fois l'hétérogénéité entre les différents fluides. Le recouvrement en taille entre les fractions a une nouvelle fois été évalué par NTA ([figure 54, C](#)) et par microscopie électronique ([figure 54, D](#)). Selon la technique et le seuil, nous retrouvons les mêmes pourcentages de répartition en taille des différentes fractions confirmant un enrichissement de petites et de grandes VEs, respectivement dans les fractions p-VEs et g-VEs. Les photos de microscopie électronique ([figure 54, E](#)) confirment l'enrichissement des VEs avec ce protocole.

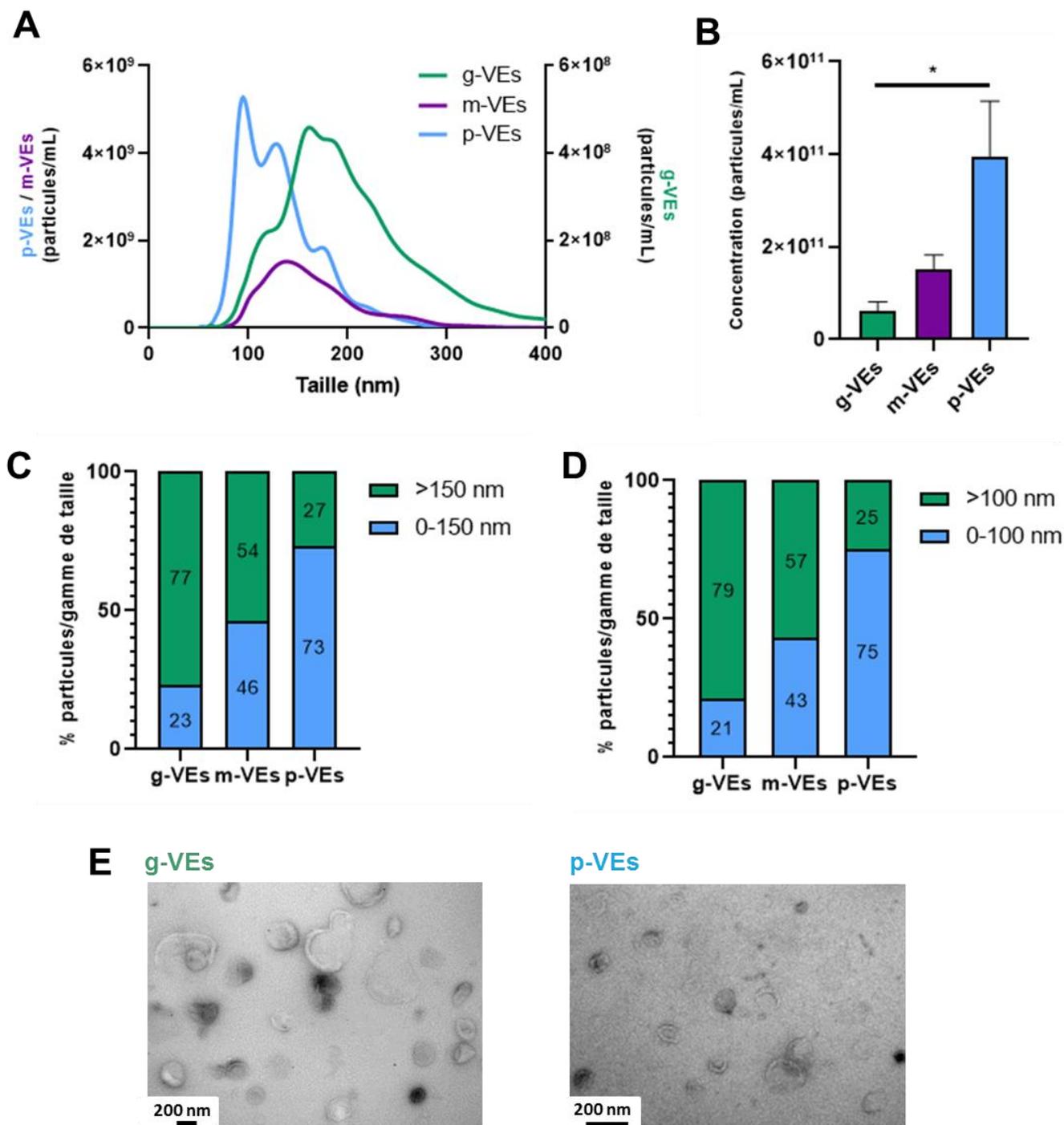


Figure 54 : Optimisation de la séparation des grandes et des petites VEs isolées à partir de FC humain. (A) Profil vésiculaire moyen en fonction de la taille. (B) Concentration vésiculaire dans les différentes fractions. Les données représentent les moyennes \pm écart-type. (C) Répartition en taille moyenne des VEs dans chaque fraction obtenue au NTA. (D) Répartition en taille moyenne des VEs dans chaque fraction après quantification des photos de microscopie électronique. (E) Photos de microscopie électronique des fractions g-VES et p-VES. N=3 sur 3 FC préfrontal issus d'individus différents. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn : * $p < 0,5$.

Nous avons pu remarquer qu'avec ce protocole, nous n'analysions pas une partie des VEs présentes dans le fluide initial (fraction m-VEs) ce qui entraîne nécessairement une perte d'informations. De plus, l'ajout des étapes d'ultracentrifugation peut induire une perte de VEs. Nous avons donc évalué cette perte entre le protocole classique de SEC (fractions 1-4) et le protocole de SEC avec les étapes d'ultracentrifugation (fractions p-VEs, m-VEs et g-VEs). La distribution en taille et la concentration vésiculaire (n=3) pour les deux protocoles sont représentés sur la **figure 55**. La perte de matériel n'est pas significative entre les deux protocoles.

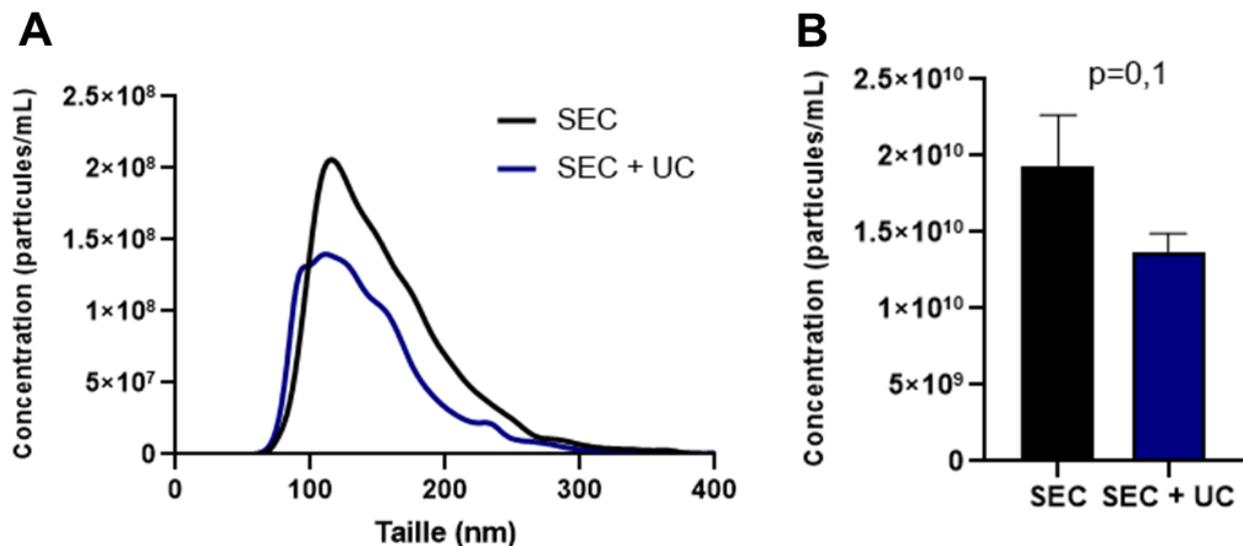


Figure 55 : Évaluation de la perte vésiculaire liée à l'ajout des étapes de centrifugation dans le protocole d'optimisation. (A) Profil vésiculaire moyen en fonction de la taille et (B) concentrations vésiculaires obtenues grâce au NTA. Les données représentent les moyennes \pm écart-type. N=3 sur 3 FC préfrontal issus d'individus différents. SEC = Fractions 1 à 4. SEC + UC = Fractions 1 à 4 ultracentrifugées comme décrit précédemment. Toutes les fractions (p-VEs, m-VEs et g-VEs) sont ensuite regroupées et le volume est ajusté à celui de la condition SEC pour évaluer la concentration finale récupérée à la fin du protocole. Test de Mann-Whitney $p=0,1$.

Une fois la mise au point et la caractérisation des p-VEs et des g-VEs réalisées, nous avons voulu évaluer leur potentiel à transporter des espèces pro-nucléantes de tau. Pour cela, nous avons transfecté dans le modèle cellulaire de FRET la même quantité de p-VEs et de g-VEs issues de fluide cérébral préfrontal de patients MA. Nous avons fait ce choix car c'est la région dans laquelle nous avons le signal FRET le plus important ainsi que celle qui a été choisie pour les injections *in vivo*. Le protocole de SEC classique (utilisé dans le chapitre précédent) et le protocole optimisé ont été comparés. La répartition en taille des VEs dans les différentes fractions a été déterminée par NTA (**figure 56, A**). Cela permet de confirmer dans cette expérience que les fractions transfectées sont bien enrichies en VEs de tailles différentes. Le signal FRET obtenu après transfection des différentes fractions vésiculaires est représenté sur la **figure 56, B**. Les g-VEs (n=4) entraînent un signal FRET significativement supérieur à celui des p-VEs. Les fractions non enrichies (SEC et m-VEs) entraînent un signal FRET à mi-chemin entre celui des fractions enrichies. Ces données montrent donc que les g-VEs transportent davantage d'espèces pro-nucléantes de tau que les p-VEs.

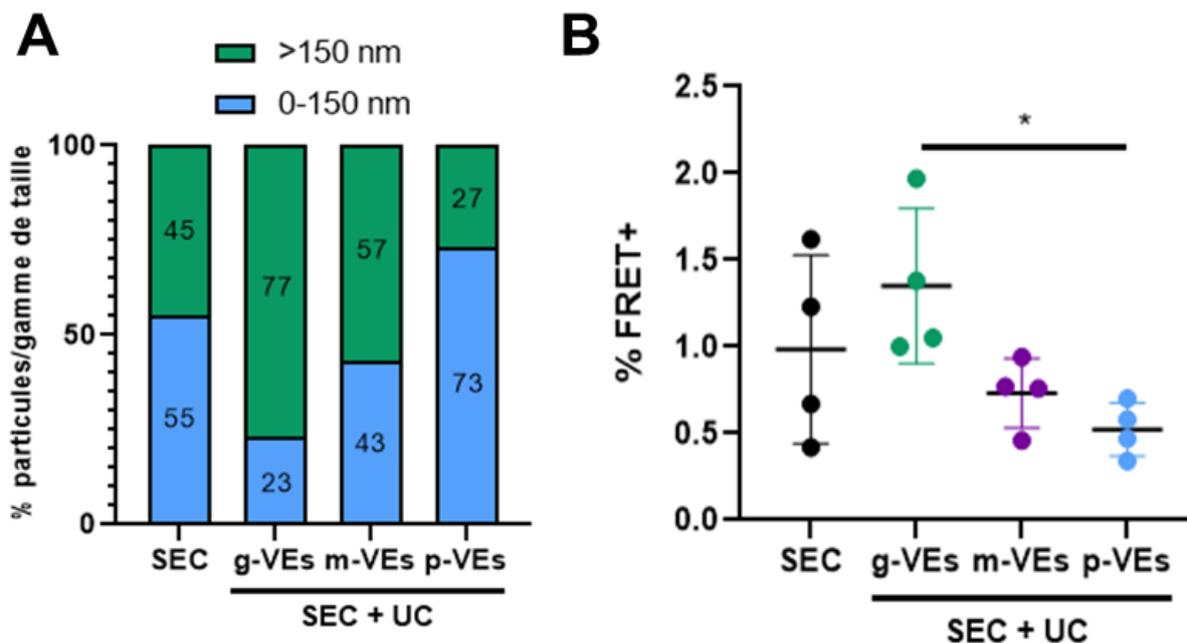


Figure 56 : Les g-VEs de FC de patients MA transportent davantage d'espèces pro-nucléantes de tau que les p-VEs. Des VEs de FC préfrontal de patients MA (n=4) ont été isolées selon le protocole de SEC classique (SEC) ou selon le protocole optimisé pour le FC humain (SEC + UC). **(A)** Répartition en taille moyenne des VEs dans chaque fraction obtenue au NTA. **(B)** 3,15x10⁹ VEs ont ensuite été transfectées dans le modèle cellulaire de FRET. 3 jours après traitement, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en %FRET+. Test de Kruskal-Wallis : *p<0,05 suivi d'un test de Dunn : *p<0,05.

Afin de mieux comprendre les différences entre les sujets contrôles et les patients MA ainsi qu'entre les p-VEs et les g-VEs, et dans l'optique d'identifier un marqueur spécifique à ces sous-populations dans le fluide cérébral, un pool de g-VEs et de p-VEs issues de fluide cérébral de 4 sujets contrôles et de 4 patients MA a été analysé par spectrométrie de masse. Une fois encore, la même quantité de VEs, et non pas la même quantité de protéines, a été analysée. Pour chaque groupe, les peptides issus des VEs ont été analysés en triplicat. Le nombre moyen de protéines identifiées et l'écart-type sont les suivants : p-VEs Ctrl = 468 ± 30, p-VEs MA = 370 ± 6, g-VEs Ctrl = 641 ± 16, g-VEs MA = 622 ± 11. Cela confirme, dans un autre fluide, que la quantité de protéines présentes dans les g-VEs est supérieure à celle présente dans les p-VEs, bien que l'écart soit moins important que pour les VEs de CP.

Le diagramme de Venn représente le nombre de protéines identifiées dans chaque groupe ainsi que le nombre de protéines communes à plusieurs groupes (**figure 57, A**). Parmi les 374 protéines communes aux 4 groupes, l'analyse des termes *Gene Ontology* pour les composants cellulaires (GOCC) permet de mettre en évidence une majorité de protéines associées aux exosomes et à la membrane plasmique (**figure 57, B**). Parmi elles, nous retrouvons des protéines décrites comme étant associées aux VEs comme CD81, CD81, CD59, CD47, ADAM10, tau, Rho A, LAMP 2, flotiline-2 ou encore HSP90 (Lo Cicero et al., 2015; Théry et al., 2018). Cela nous permet de valider la présence de VEs dans nos échantillons.

Lorsque les 4 groupes sont comparés entre eux, le diagramme de Venn permet d'identifier des protéines présentes uniquement dans un groupe (62 dans p-VEs Ctrl, 2 dans p-VEs MA, 35 dans g-VEs Ctrl et 10 dans g-VEs MA) et donc pouvant servir de marqueurs potentiels à chacun des groupes. De plus, 11 protéines sont retrouvées uniquement dans les p-VEs quel que soit le groupe de sujets, et 159 protéines sont identifiées uniquement dans les g-VEs. L'écart entre le nombre de protéines identifiées dans les p-VEs et les g-VEs peut s'expliquer une nouvelle fois par le fait qu'il y ait plus de protéines dans les g-VEs que dans les p-VEs. Quoiqu'il en soit, ces protéines pourraient servir de marqueurs spécifiques aux p-VEs et aux g-VEs dans le fluide cérébral humain. Nous devons maintenant identifier lesquelles sont des protéines transmembranaires et confirmer leur présence dans chaque sous-population autrement que par spectrométrie de masse, par exemple par immunomarquage en microscopie électronique. Cette identification permettrait d'isoler les p-VEs des g-VEs par immunocapture afin d'optimiser la pureté des fractions. Parmi toutes les protéines identifiées, 414 se trouvent significativement sur- ou sous-exprimées en fonction des 4 groupes (**figure 57, C**). Cette analyse nous a permis d'identifier 8 clusters différents permettant de différencier les sujets contrôles des patients MA, mais aussi les p-VEs des g-VEs. Ces clusters peuvent constituer des signatures moléculaires spécifiques à chaque groupe et ainsi permettre de mieux comprendre les caractéristiques des VEes présentes dans le fluide cérébral humain. Enfin, parmi les protéines identifiées, nous pouvons également souligner la présence de protéines associées aux neurones (NCAM), aux astrocytes (GFAP, S100B et AQP4) et aux oligodendrocytes (MOG, PLP, MBP). Les protéines classiquement associées aux cellules microgliales comme Iba1 ou CD11b n'ont pas été identifiées ce qui ne démontre pas pour autant l'absence de VEes d'origine microgliale. En effet, le fluide cérébral est issu d'un tissu cérébral où toutes les cellules produisent des VEes. L'identification de marqueurs de l'origine cellulaire présents au niveau des VEes est à confirmer mais pourrait permettre d'immuno-sélectionner les VEes libérées par les neurones ou les cellules gliales afin d'étudier séparément leur rôle dans la propagation de la pathologie tau.

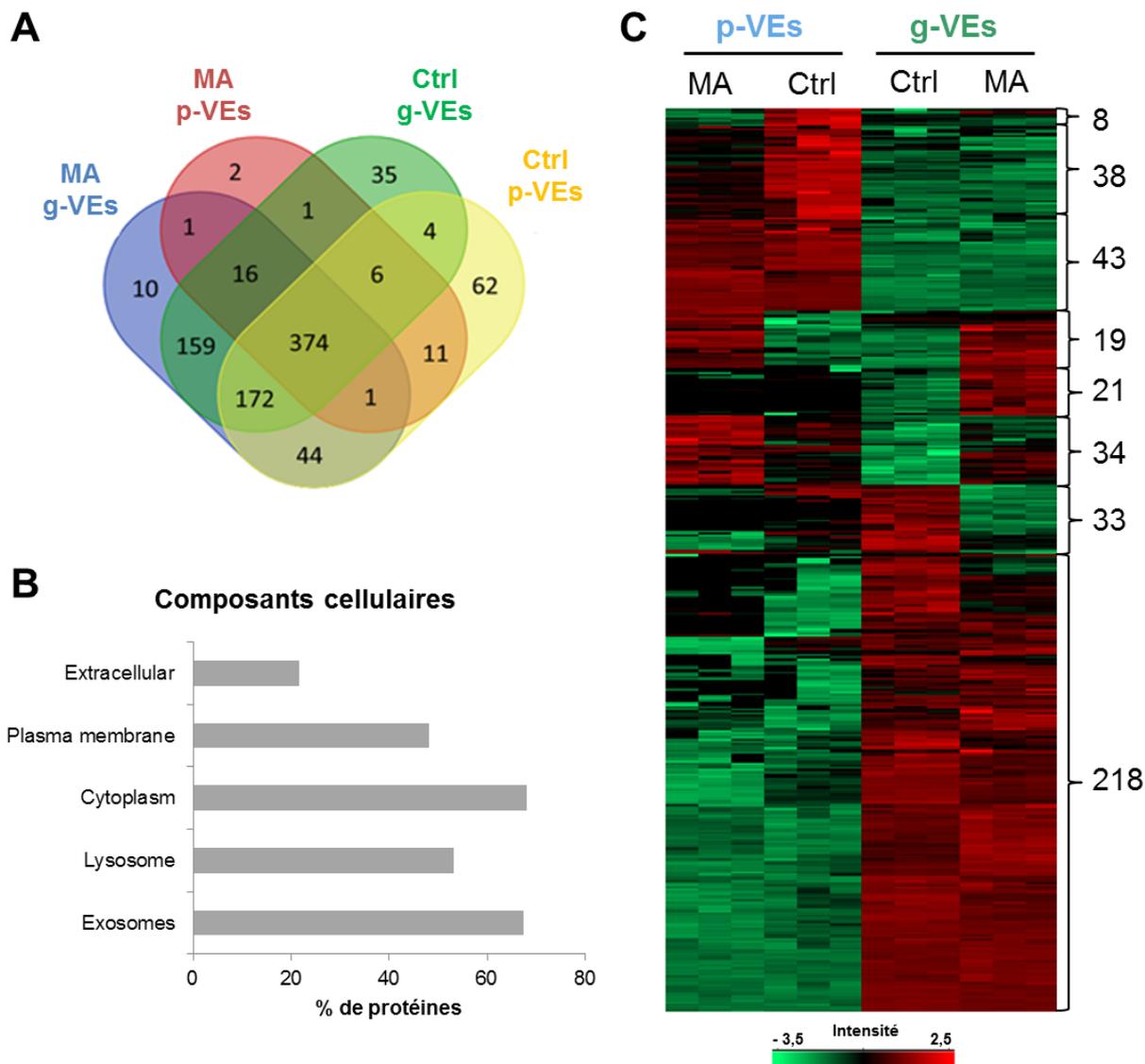
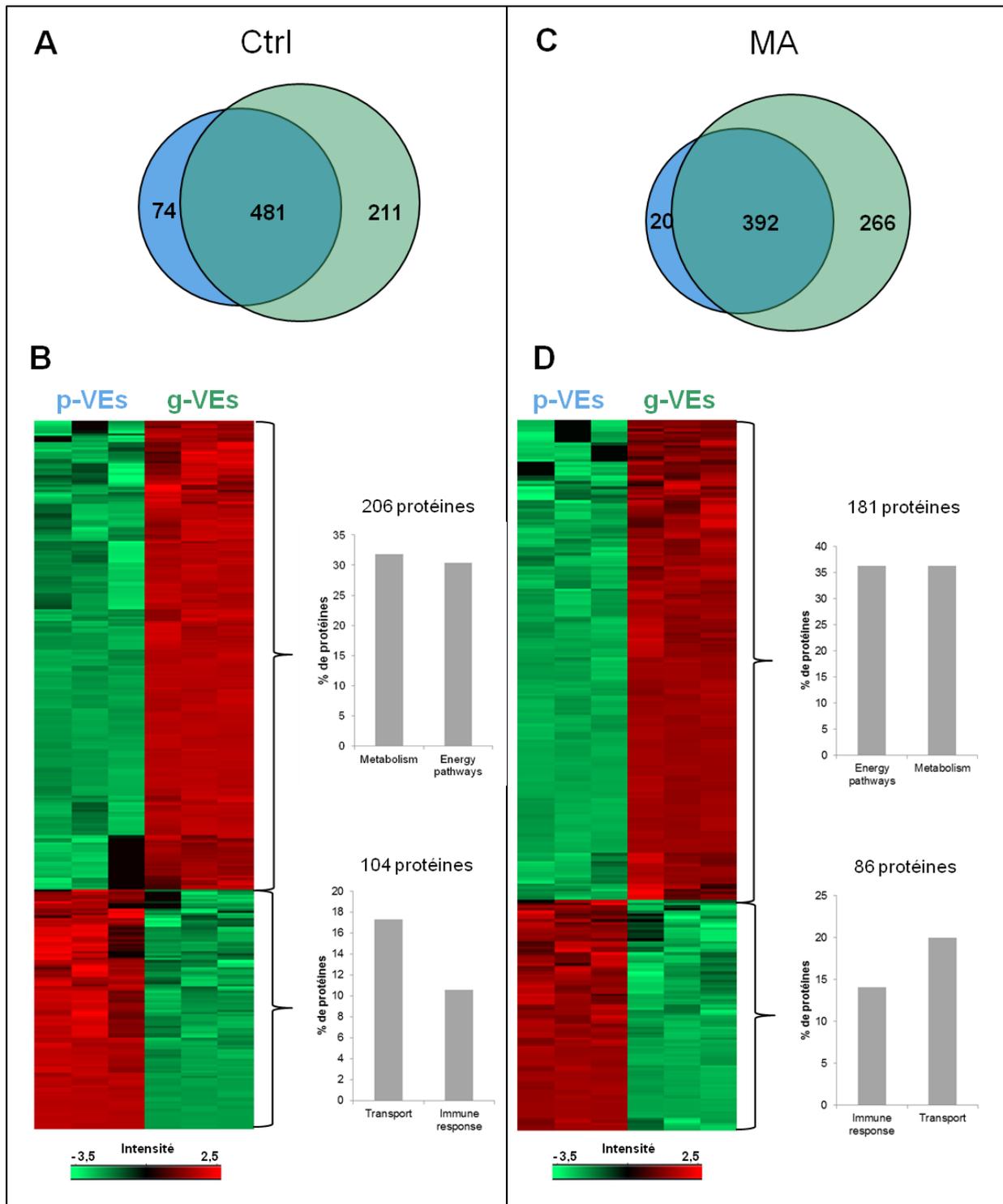


Figure 57 : Analyse descriptive des 4 groupes vésiculaires. (A) Diagramme de Venn des protéines identifiées dans les 4 groupes. Les croisements entre plusieurs cercles représentent le nombre de protéines communes aux différents groupes. (B) Pourcentage des protéines communes aux quatre groupes pour le *GO terms Cellular Component* dans le logiciel FunRich. (C) Heat-map des protéines significativement sur-exprimées (rouge) ou sous-exprimées (vert) en fonction des différents groupes. ANOVA : $p < 0,01$ pour 414 protéines. 8 clusters différents peuvent être identifiés sur la heat-map. Les peptides digérés à partir de 5×10^{10} VEs issues de FC préfrontal de 4 sujets contrôles et de 4 patients MA ont été analysés par spectrométrie de masse NanoLC-MS/MS en triplicat.

Nous avons ensuite réalisé des comparaisons 2 à 2 entre les groupes. La comparaison entre les p-VEs et les g-VEs pour chaque groupe de sujets a pour but de confirmer l'isolement de deux populations vésiculaires distinctes avec notre protocole reposant sur d'autres critères que la taille (figure 58). Les diagrammes de Venn (figure 58, A et C) représentent le nombre de protéines identifiées dans chaque fraction ainsi que le nombre de protéines communes aux deux fractions. Parmi les protéines communes, 310 protéines pour les sujets contrôles (figure 58, B) et 267 pour les patients MA (figure 58, D) se trouvent significativement sur- ou sous-exprimées

par rapport à l'autre groupe. Lorsque nous nous intéressons aux processus biologiques dans lesquels sont impliquées ces protéines, il est intéressant de noter que quel que soit le groupe de sujets, les protéines sur-exprimées dans les g-VEs (ou sous-exprimées dans les p-VEs) sont impliquées dans le métabolisme et les voies énergétiques ($p < 0,05$). Les protéines sous-exprimées dans les g-VEs (ou sur-exprimées dans les p-VEs) sont quant à elles impliquées dans le transport et la réponse immunitaire ($p < 0,05$). En fonction de leur taille, les VEs sont donc impliquées dans des processus biologiques différents, ce qui tend à confirmer que les p-VEs et les g-VEs ont bien, en plus de la taille, des caractéristiques différentes justifiant l'intérêt de les étudier séparément.



(figure page précédente)

Figure 58 : Analyse protéomique différentielle entre les p-VEs et les g-VEs pour chaque groupe de sujets. (A-C) Diagramme de Venn des protéines identifiées dans les p-VEs (bleu) et les g-VEs (vert) des sujets contrôles (A) et des patients MA (C). Le croisement entre les deux cercles représente le nombre de protéines communes aux deux sous-groupes vésiculaires. (B-D) Heat-map des protéines significativement sur-exprimées (rouge) ou sous-exprimées (vert) parmi les 481 (B) ou 392 (D) protéines communes. T-test: $p < 0,01$. Pour chacun des quatre clusters identifiés, le pourcentage des protéines pour les *GO terms Biological process* (non exhaustif) est représenté ainsi que le nombre de protéines significatives dans chaque cluster.

La comparaison entre les sujets contrôles et les patients MA pour chaque sous-groupe vésiculaire a ensuite été réalisée dans le but de comprendre les conséquences de la pathologie sur le contenu des différentes populations vésiculaires. Dans le but de définir une cible thérapeutique bloquant la propagation de la pathologie tau, ces informations sont importantes pour nous aider à différencier les VE impliquées dans les processus physiologiques et celles impliquées dans les processus pathologiques. Les diagrammes de Venn (figure 59, A et C) représentent le nombre de protéines identifiées dans chaque fraction ainsi que le nombre de protéines communes aux deux fractions. Parmi les protéines communes, 126 protéines pour les p-VEs (figure 59, B) et 212 pour g-VEs (figure 59, D) se trouvent significativement sur- ou sous-exprimées par rapport à l'autre groupe. Lorsque nous nous intéressons aux processus biologiques dans lesquels sont impliquées ces protéines, il est intéressant de noter que pour la MA, les protéines sous-exprimées dans les p-VEs et celles sur-exprimées dans les g-VEs ($p < 0,05$) sont impliquées dans le métabolisme et les voies énergétiques alors que celles qui sont sur-exprimées dans les p-VEs et sous-exprimées dans les g-VEs ($p < 0,05$) sont impliquées dans le transport et la croissance cellulaire. Le profil inverse est observé chez les sujets contrôles. Les protéines impliquées dans les différents processus biologiques semblent donc emprunter des voies de sécrétion vésiculaire distinctes en fonction du contexte physiopathologique.

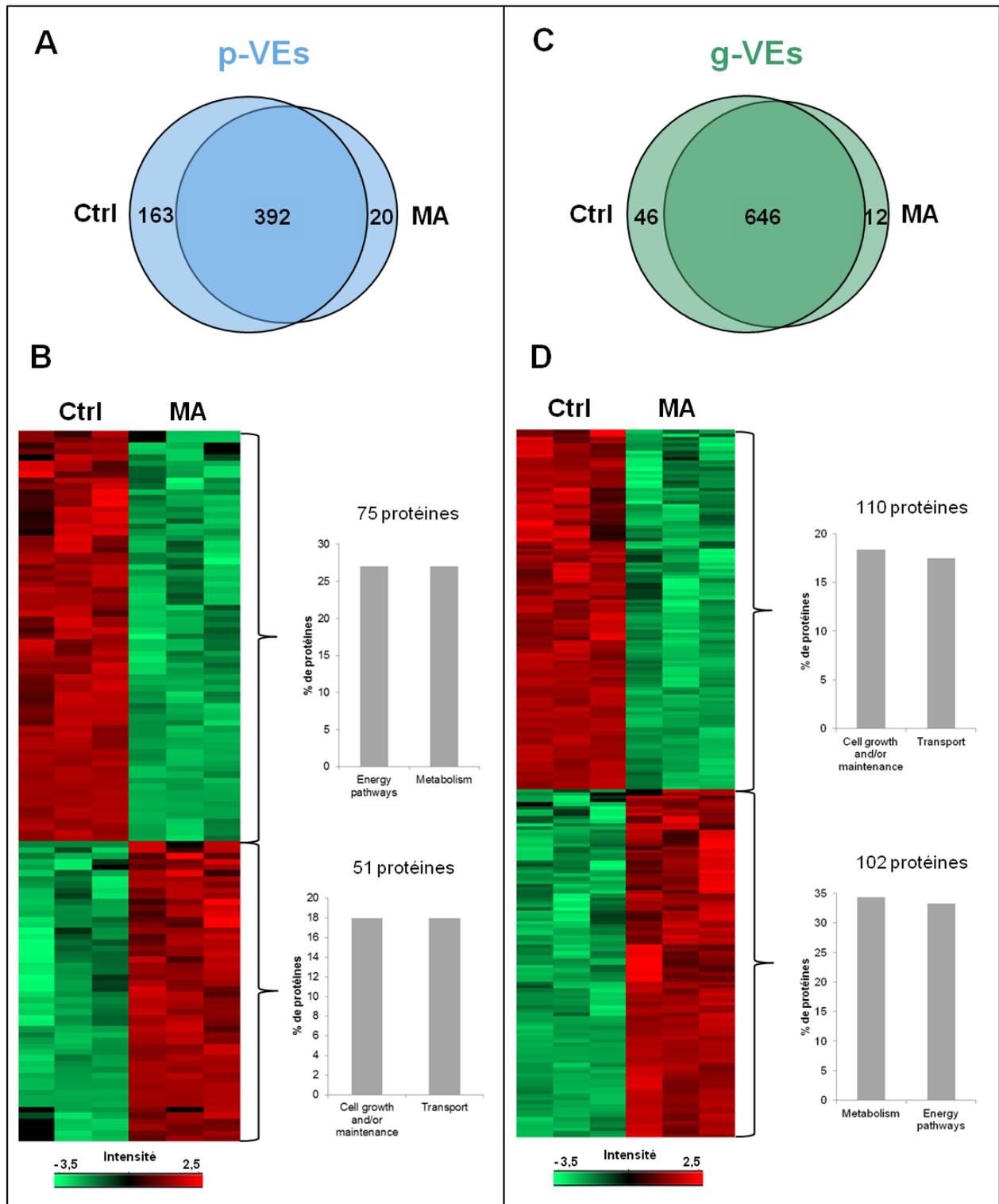


Figure 59 : Analyse protéomique différentielle entre les sujets contrôles et les patients MA pour chaque groupe de VEs. (A-C) Diagramme de Venn des protéines identifiées chez les contrôles et les MA dans les p-VEs (A) et dans les g-VEs (C). Le croisement entre les deux cercles représente le nombre de protéines communes aux deux sous-groupes vésiculaires. (B-D) Heat-map des protéines significativement sur-exprimées (rouge) ou sous-exprimées (vert) parmi les 392 (B) ou 646 (D) protéines communes. T-test : $p < 0,01$. Pour chacun des quatre clusters identifiés, le pourcentage des protéines pour les *GO terms Biological process* (non exhaustif) est représenté ainsi que le nombre de protéines significatives dans chaque cluster.

Discussion - Conclusion

Dans cette partie, nous avons combiné plusieurs techniques d'isolement vésiculaire pour séparer différentes sous-populations de VEs. Le but est de mieux comprendre quelles sont les VEs impliquées dans la propagation de la pathologie tau. Ici, le critère de cette séparation était la taille. L'ajout d'étapes d'ultracentrifugation après la SEC, permettant de séparer les VEs des protéines libres, nous a permis de séparer les plus grandes VEs des plus petites. Dans le fluide cérébral (FC) de patients MA, nous avons montré que les g-VEs transportent plus d'espèces pro-nucléantes que les p-VEs. Cependant, pris dans son ensemble, le fluide cérébral contient plus de p-VEs que de g-VEs. Il est donc probable que sans normaliser la transfection des VEs dans le modèle FRET à une quantité de VEs, le signal obtenu serait similaire entre les p-VEs et les g-VEs. Les résultats obtenus en FRET présentés cette partie pourraient donc s'expliquer par la présence d'une quantité plus importante de protéines dans les g-VEs plutôt que par un adressage spécifique des espèces pro-nucléantes dans les g-VEs.

Les premières analyses par spectrométrie de masse, réalisées à partir d'un regroupement de plusieurs sujets, ont permis de valider l'isolement de populations vésiculaires distinctes, du fait des signatures protéiques spécifiques que nous avons mis en évidence entre les groupes. Ces analyses seront à répéter sur des VEs préparées à partir de sujets individuels afin de valider ou non nos premières données et d'identifier des marqueurs spécifiques à chaque sous-population vésiculaire. Nos résultats permettent également d'identifier des marqueurs vésiculaires spécifiques à chaque type cellulaire (neurone, microglie, astrocyte ou oligodendrocyte). L'idée étant d'identifier des protéines situées à la membrane des VEs que nous pouvons cibler à l'aide d'anticorps, afin de sélectionner les VEs en fonction de leur origine cellulaire et ainsi mieux comprendre d'où proviennent les VEs qui transportent les espèces pro-nucléantes de tau. En effet, selon la tauopathie étudiée, les inclusions de protéines tau peuvent être présentes au niveau neuronal mais aussi glial, comme dans la PSP. L'origine des VEs responsables de la propagation pourrait donc varier d'une maladie à l'autre. Dans la majorité des études, les neurones sont au centre de l'attention mais certains chercheurs se sont également intéressés aux astrocytes et à la microglie. Le transfert de la protéine tau des neurones aux astrocytes a été démontré *in vivo* dans un modèle de souris transgénique (Maté de Gérando et al., 2021). Ils montrent que les lésions astrocytaires sont secondaires aux lésions neuronales, ce qui sous-tend une internalisation d'espèces de tau provenant des neurones et non la formation d'inclusions *de novo* dans les astrocytes. Certains astrocytes sont plus vulnérables face à la pathologie (Maté de Gérando et al., 2021). Une autre étude a montré qu'une perte de l'homéostasie de la protéine tau dans les astrocytes du gyrus denté est suffisante pour induire une altération du réseau neuronal (Richetin et al., 2020). Les astrocytes ne sont donc pas des simples spectateurs de la pathologie neuronale. À travers deux autres études, un groupe a également mis en évidence l'implication des cellules microgliales dans la propagation de la pathologie tau (Asai et al., 2015; Clayton et al., 2021). Alors qu'elles semblent permettre de phagocyter les lésions associées à tau et à A β , leur déplétion entraîne une propagation plus importante de la pathologie tau. Cela serait dû à une libération importante de VEs contenant tau par les microglies qui digèrent les lésions.

Au-delà des aspects mécanistiques, un autre objectif consiste à identifier des protéines situées à la membrane des VEs qu'il serait possible de cibler, par immunothérapie par exemple, pour bloquer les VEs responsables de la propagation de la pathologie. Il serait également intéressant de faire une étude lipidomique des VEs de façon à décrypter l'identité des VEs

impliquées dans la propagation. Une étude récente montre notamment des différences d'enrichissement lipidique entre des VEs de FC de patients MA et de sujets contrôles (Su et al., 2021).

À l'heure actuelle, il n'existe pas de technique d'isolement séparant les VEs selon leur taille. Nous pouvons espérer que, par exemple, l'amélioration de la résolution des cytomètres en flux ou le développement de nouvelles résines pour la SEC apporteront des solutions. Cependant, nous pouvons nous interroger sur la pertinence de notre séparation basée sur la taille. En effet, nous avons pu voir précédemment qu'il existe un recouvrement en taille important entre les exosomes et les microparticules (Mathieu et al., 2019) et dans le fluide cérébral, nous ne savons encore rien sur la taille des VEs selon leur voie de biogenèse et leur origine cellulaire.

II- Les VEs comme biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer ?

La seconde partie de ce travail consiste non plus à comprendre les mécanismes de la propagation de la pathologie tau dans le cerveau, mais plutôt à identifier des biomarqueurs de la pathologie dans les fluides biologiques périphériques (LCS et plasma). En effet, même s'il est important de comprendre comment la maladie se propage pour pouvoir développer des outils thérapeutiques, il est également nécessaire d'identifier des biomarqueurs permettant de diagnostiquer précocement la pathologie avant qu'elle ne se soit trop propagée et donc avant l'apparition des premiers symptômes. Cela permettra d'améliorer la fiabilité du diagnostic et de proposer la prise en charge la plus adaptée possible.

Dans cette partie, nous avons travaillé à partir de LCS et de plasma de patients MA uniquement. Les autres tauopathies étant beaucoup plus rares et difficiles à diagnostiquer, il y a trop peu de fluides biologiques disponibles en biobanque pour réaliser une étude statistiquement interprétable. De plus, pour faire le lien avec nos données sur l'implication des VEs dans la propagation et face à l'intérêt croissant des VEs comme biomarqueurs de diverses pathologies (Gámez-Valero et al., 2019; Hoshino et al., 2020; Pang et al., 2020), nous avons focalisé nos travaux sur les VEs présentes dans le LCS et le plasma. Nous avons tout d'abord cherché à savoir si les VEs contenant des espèces pro-nucléantes de tau peuvent se retrouver dans ces fluides. Auquel cas, cela pourrait servir de biomarqueur de la pathologie. Nous avons également constitué une cohorte de patients pour laquelle les VEs du LCS et du plasma sont analysées, toujours dans le but d'identifier de nouveaux biomarqueurs de la MA. Les premières données sont présentées dans ce travail.

1. Absence de détection d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs de LCS et de plasma

Nous avons d'abord cherché à valider la présence de VEs dans le LCS humain congelé. La SEC a été utilisée car elle permet de séparer les VEs des contaminants protéiques comme décrit précédemment (Böing et al., 2014; Norman et al., 2021). Dans chaque fraction, la concentration vésiculaire a été déterminée par NTA (**figure 60, A, vert**) et la concentration protéique a été déterminée par spectrophotométrie UV (**figure 60, A, rouge**) et par coloration au nitrate d'argent (**figure 60, B**). Les résultats confirment la séparation entre les VEs et les protéines libres. Les fractions 1 à 4 ont été regroupées comme précédemment pour former la fraction VEs. Sa concentration vésiculaire en fonction de la taille est représentée sur la **figure 60, C**. Le LCS contient des VEs de 50 nm à 300 nm. La microscopie électronique confirme la présence de VEs même après congélation (**figure 60, D**).

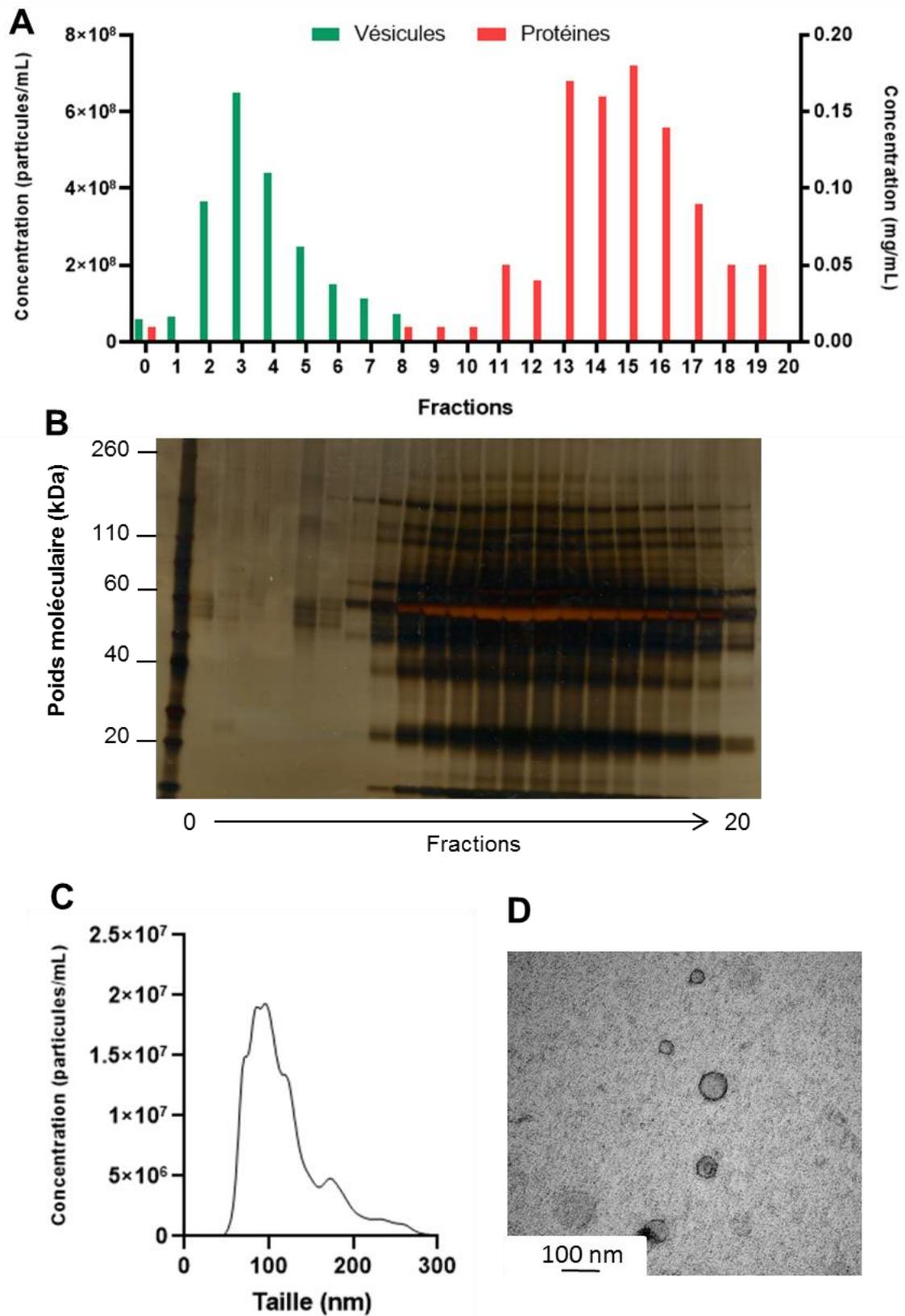


Figure 60 : Le LCS contient des VEs. 500 μ L de LCS humain ante-mortem sont déposés sur une colonne pour séparer les VEs des protéines libres par SEC. Pour chaque fraction de 500 μ L collectée, la concentration vésiculaire est évaluée par NTA (vert, **A**) et la concentration protéique est évaluée par spectrophotométrie UV (rouge, **A**) ou par coloration au nitrate d'argent (**B**). Les fractions 1 à 4 sont rassemblées pour constituer la fraction vésiculaire. La concentration vésiculaire en fonction de la taille (**C**) et la morphologie des VEs (**D**) dans ces fractions sont représentées.

La détection de la protéine tau et de sa forme phosphorylée sur la thréonine 181 (ptau-181) dans le LCS est maintenant utilisée pour le diagnostic de la MA (M. Leroy et al., 2021). Seules quelques données montrent la présence de tau dans les VEs de LCS (Saman et al., 2012; Y. Wang et al., 2017). Étant donné qu'environ 20% du LCS provient de l'ISF, il est légitime de se demander si les VEs cérébrales contenant des espèces pro-nucléantes de tau peuvent passer dans le LCS et servir ainsi de biomarqueurs pour diagnostiquer les tauopathies.

Nous avons donc évalué la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs de LCS à l'aide du modèle cellulaire de FRET précédemment utilisé. Pour cela, les VEs isolées à partir de 500 µL de LCS congelés de sujets non déments (**tableaux 7, Annexe page 204**) ou de patients MA (**tableau 8, Annexe page 205**), prélevés par ponction lombaire, ont été transfectées dans le modèle cellulaire. Le signal obtenu pour chaque sujet est représenté sur la **figure 61**. Aucune différence significative n'existe entre les deux groupes suggérant que les VEs transportant des espèces pro-nucléantes de tau ne sont pas présentes ou pas détectables dans le LCS.

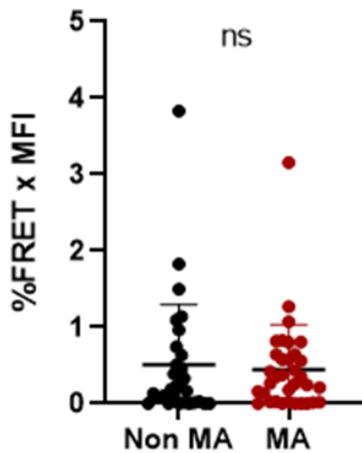


Figure 61 : Absence de détection d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs de LCS de patients MA. Les VEs contenues dans 500 µL de LCS de patients MA (n=35) ou non MA (n=32) ont été transfectées dans le modèle cellulaire de FRET. 3 jours après traitement, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en %FRET x MFI. Test T de Student non significatif (ns), $p > 0,05$.

Il est toutefois important de remarquer que la concentration des VEs isolées à partir de 500 µL de LCS est significativement inférieure à celle isolée à partir de 500 µL de fluide cérébral (**figure 62**). Cette différence pourrait expliquer l'absence de détection d'espèces pro-nucléantes dans le LCS.

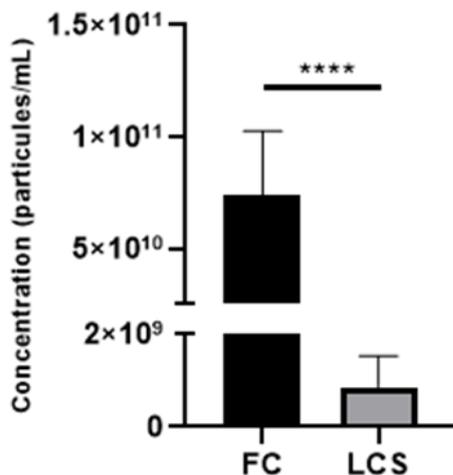
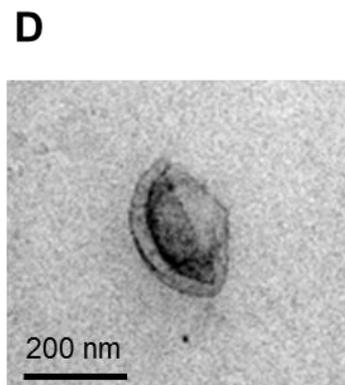
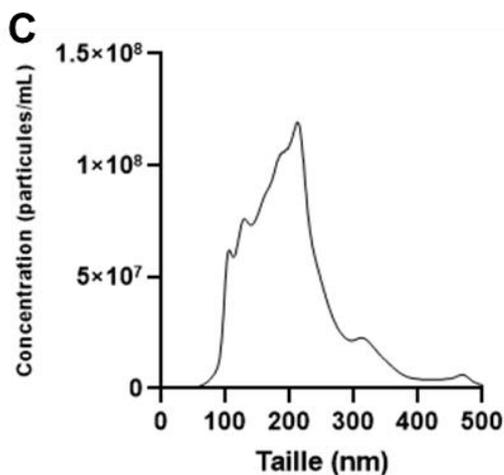
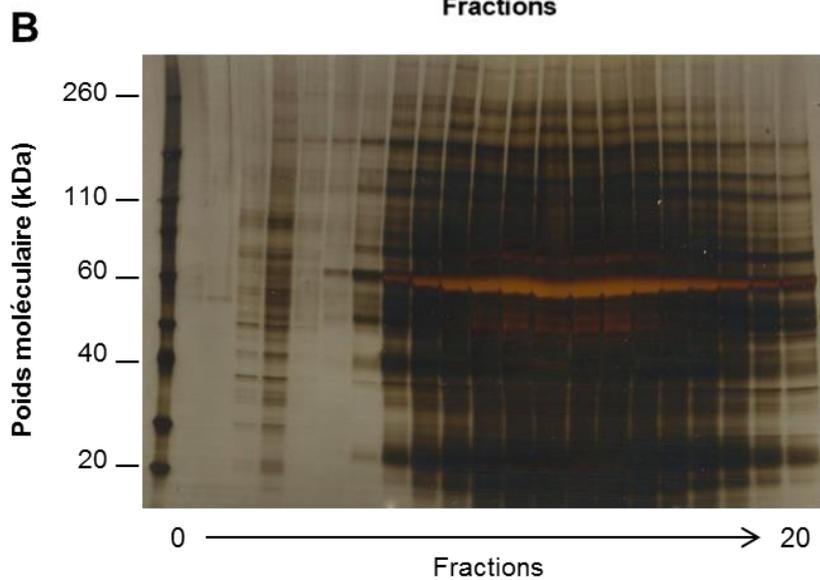
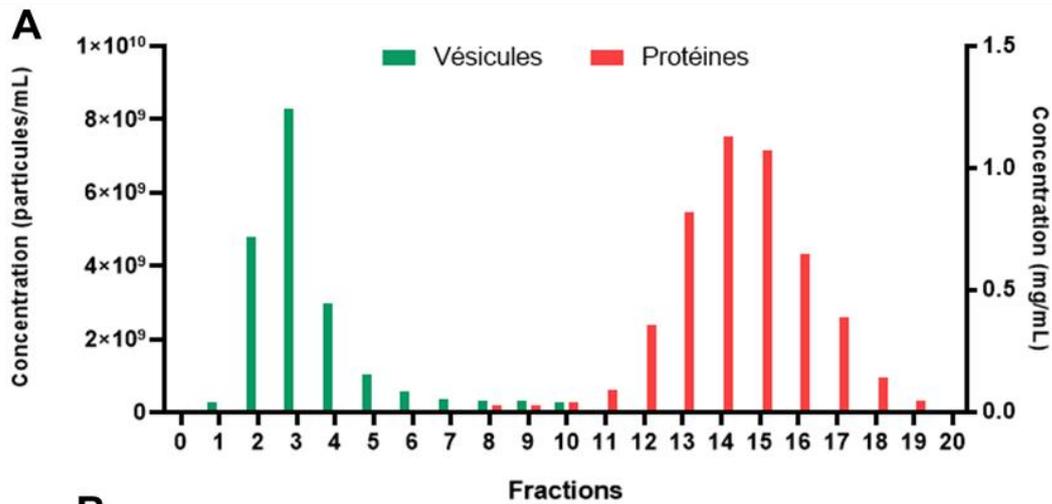


Figure 62 : Concentration vésiculaire dans le FC et le LCS humains. Les concentrations ont été déterminées par NTA à partir de VEs isolées à partir de 500 µL de FC (n=73) normalisées au poids du tissu, et de VEs isolées à partir de 500 µL de LCS (n=56) de la cohorte ecTAUsome (5 groupes confondus, voir section matériels et méthodes, I-3.3). Les résultats représentent les moyennes ± écart-types. Test T de Student significatif, **** $p < 0,0001$.

Après avoir évalué la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VE de LCS lombaire, nous avons évalué leur présence dans les VE de LCS intraventriculaire prélevé en post-mortem. En effet, l'accès au LCS intraventriculaire n'est pas possible du vivant des patients, en dehors des cas d'hydrocéphalie qui ne sont pas forcément des patients MA ou ayant des troubles cognitifs. Les VE ont été isolées par SEC et caractérisées comme pour le LCS ante-mortem (**figure 63**). Les données confirment la présence de VE (fraction 1-4) de 80 nm à 500 nm dans le LCS intraventriculaire.



(figure page précédente)

Figure 63 : Le LCS intraventriculaire contient des VEs. 500 μ L de LCS intraventriculaire humain post-mortem sont déposés sur une colonne pour séparer les VEs des protéines libres par SEC. Pour chaque fraction de 500 μ L collectée, la concentration vésiculaire est évaluée par NTA (vert, **A**) et la concentration protéique est évaluée par spectrophotométrie UV (rouge, **A**) ou par coloration au nitrate d'argent (**B**). Les fractions 1 à 4 sont rassemblées pour constituer la fraction vésiculaire. La concentration vésiculaire en fonction de la taille (**C**) et la morphologie des VEs (**D**) dans ces fractions sont représentées.

À l'aide du modèle cellulaire de FRET, nous avons évalué la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs de LCS intraventriculaire de patients atteints de différentes tauopathies selon le diagnostic établi après l'autopsie (**tableau 9, Annexe page 206**). Ici, les VEs isolées à partir de 500 μ L de LCS intraventriculaire ont été comparées à celles isolées à partir de 500 μ L de LCS lombaire également prélevés au moment de l'autopsie. Le signal obtenu pour chaque prélèvement est représenté sur la **figure 64**. Nous n'avons pas pu obtenir de LCS intraventriculaire de sujets contrôles pour faire une comparaison statistique. De plus, il s'agit de patients avec des tauopathies différentes qui ne peuvent pas être comparées entre elles. Néanmoins, le signal FRET enregistré dans le LCS intraventriculaire est supérieur à celui enregistré dans le LCS lombaire, comme démontré précédemment dans du LCS de patients MA (Takeda et al., 2016). Il semblerait donc qu'il existe un gradient entre les ventricules situés à l'intérieur du parenchyme cérébral et le LCS lombaire prélevé au niveau inférieur de la colonne vertébrale.

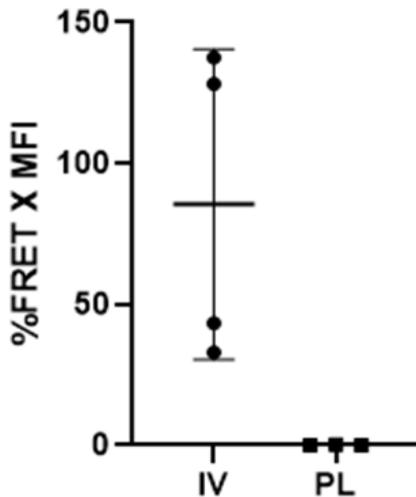


Figure 64 : Des espèces pro-nucléantes de tau sont détectées dans les VEs de LCS intraventriculaire. Les VEs contenues dans 500 μ L de LCS post-mortem intraventriculaire (IV) (n=4) ou lombaire (PL) (n=3) de patients atteints de différentes tauopathies ont été transfectées dans le modèle cellulaire de FRET. 3 jours après traitement, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en %FRET x MFI.

Toutefois, il est important de préciser que selon la technique de prélèvement du LCS, le signal FRET obtenu après transfection des VEs est différent (**figure 65**). Pour le patient X, les LCS intraventriculaire et lombaire ont été prélevés par aspiration directe à l'aide d'une seringue. L'aiguille de la seringue traverse donc le parenchyme cérébral pour atteindre les ventricules latéraux. Pour le patient Y, une canule est utilisée pour accéder aux ventricules. La seringue passe à travers cette canule et n'est donc pas en contact avec le parenchyme cérébral. Dans ce cas de figure, le signal FRET obtenu est très faible. Cela suggère donc que la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs de LCS intraventriculaire serait due à une contamination par

du tissu cérébral contenant des espèces pro-nucléantes. Toutefois, un seul prélèvement a pu être réalisé pour tester cette hypothèse, ce qui n'est pas suffisant pour conclure sur la présence de VEs contenant des espèces pro-nucléantes dans le LCS intraventriculaire et sur l'existence d'un gradient entre les LCS intraventriculaire et lombaire.

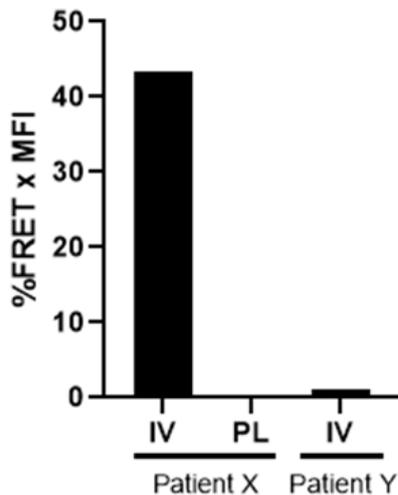
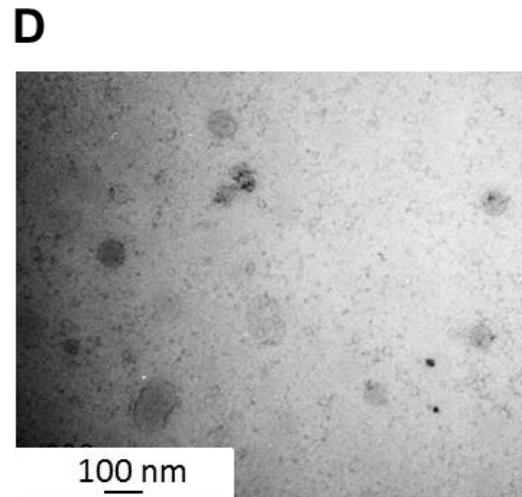
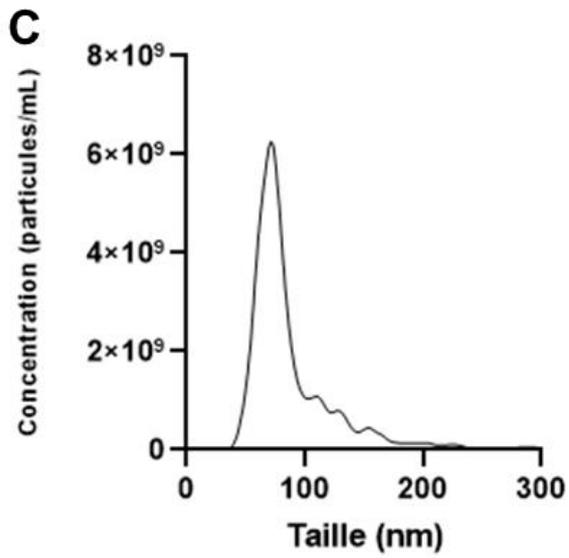
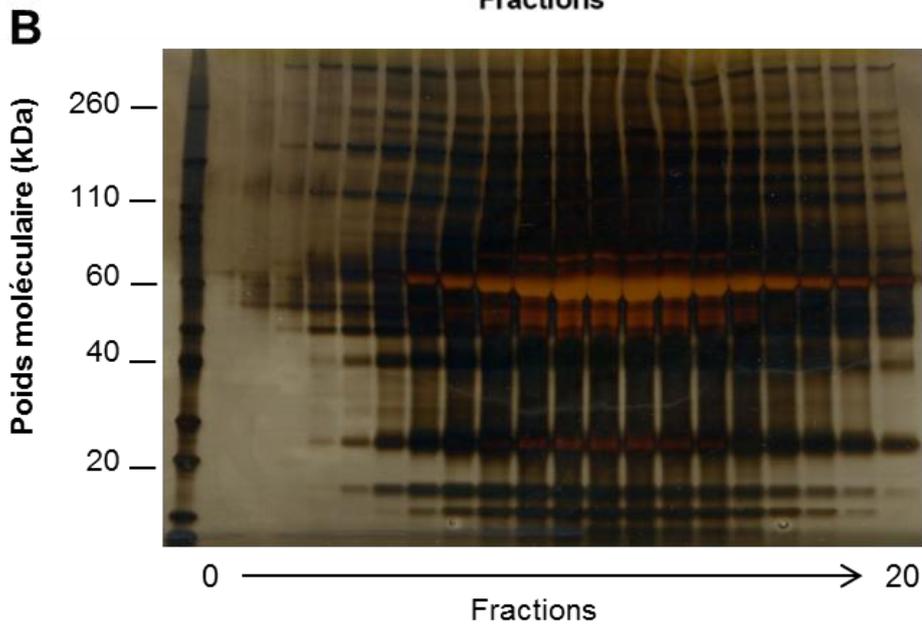
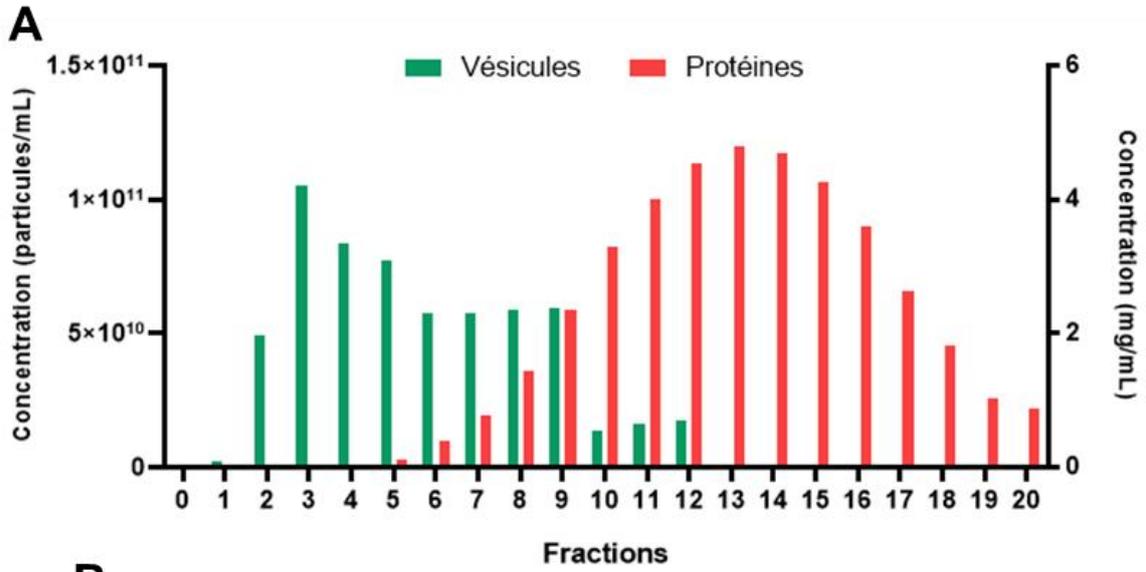


Figure 65 : La technique de prélèvement en post-mortem peut influencer la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs de LCS. Le LCS intraventriculaire (IV) du patient X atteint de MA a été prélevé à l'aide d'une seringue enfoncée à travers le parenchyme jusqu'aux ventricules latéraux. Celui du patient Y (diagnostic clinique de MA mais données anatomopathologiques non disponibles) a été prélevé à l'aide du canule enfoncée dans le parenchyme, dans laquelle passe ensuite la seringue. Les VEs issues de 500 μ L de ces LCS ont été transfectées dans le modèle cellulaire de FRET. Les résultats sont exprimés en %FRET x MFI. PL : Ponction lombaire. N=1

Enfin, nous nous sommes intéressés aux VEs plasmatiques. La SEC a une nouvelle fois été utilisée pour isoler les VEs du plasma. La même caractérisation que pour le LCS a été réalisée (**figure 66**). Les données montrent la présence de VEs (fraction 1-4) de 50 nm à 180 nm dans le plasma après congélation.

(figure page suivante)

Figure 66 : Le plasma contient des VEs. 500 μ L de plasma humain ante-mortem sont déposés sur une colonne pour séparer les VEs des protéines libres par SEC. Pour chaque fraction de 500 μ L collectée, la concentration vésiculaire est évaluée par NTA (vert, **A**) et la concentration protéique est évaluée par spectrophotométrie UV (rouge, **A**) ou par coloration au nitrate d'argent (**B**). Les fractions 1 à 4 sont rassemblées pour constituer la fraction vésiculaire. La concentration vésiculaire en fonction de la taille (**C**) et la morphologie des VEs (**D**) dans ces fractions sont représentées.



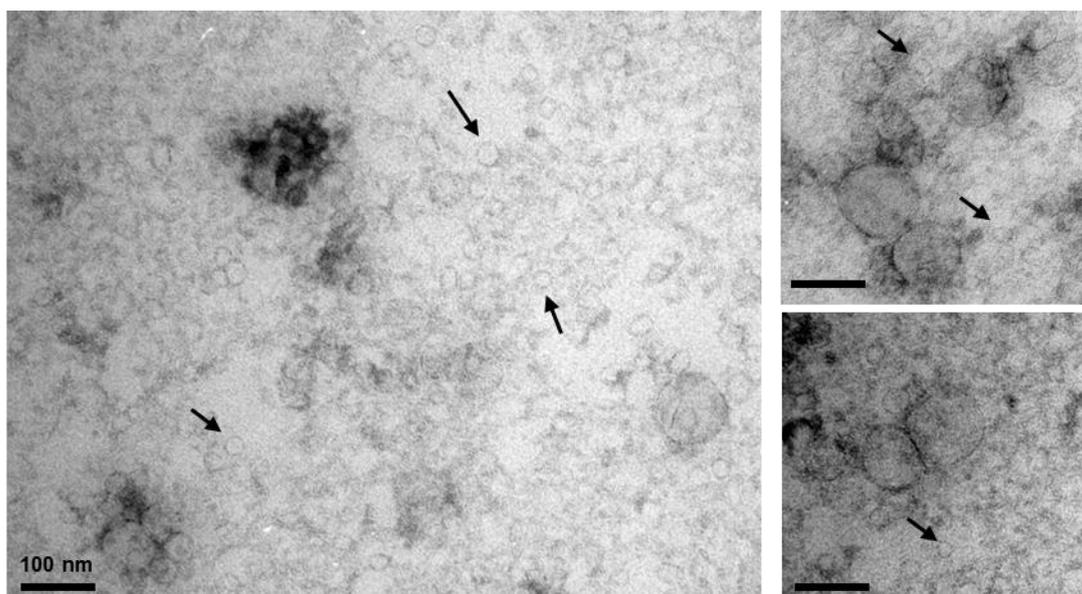


Figure 68 : Photos de microscopie électronique de la fraction vésiculaire plasmatique obtenue par SEC. Les flèches pointent des structures sphériques d'environ 20 nm de diamètre. Les photos sont prises au même grossissement.

2. La cohorte ecTAUsome

Le projet ecTAUsome fait suite à la mise en évidence dans le laboratoire de la présence de tau intravésiculaire dans des modèles cellulaires (Dujardin, Bégard, et al., 2014) et animaux (murins et primates non humains ; données non publiées). Dans cette étude pilote, 5 groupes différents ont été constitués : (1) contrôles, (2) asymptomatiques à risque de développer la MA, (3) avec plaintes mnésiques mais sans trouble avéré, (4) avec déficit cognitif léger (MCI), (5) diagnostic de MA. Le but est de déterminer si, chez l'Homme, les VEs du LCS et du plasma contiennent la protéine tau et d'établir une corrélation avec l'évolution de la pathologie. L'hypothèse sur laquelle repose cette étude est schématisée sur la [figure 69](#). L'augmentation de la concentration en protéines tau dans le LCS a d'abord été décrite comme une libération passive liée à l'augmentation de la mort neuronale due à la pathologie (Arai et al., 1995; Hall & Saman, 2012; Tato et al., 1995). Cependant, il a ensuite été mis en évidence, dans de nombreux modèles, une altération de l'homéostasie neuronale avant l'apparition des DNF puis la mort neuronale (Gibbons et al., 2019; Morsch et al., 1999) ainsi qu'une sécrétion active de la protéine tau (Croft et al., 2017; Medina & Avila, 2014; Merezhko et al., 2020; Pooler et al., 2013). De ce fait, avant que la mort neuronale ne soit trop importante et donc dans les stades prodromaux de la MA, la protéine tau pourrait être activement sécrétée par des neurones vivants via les VEs. Ces dernières pourraient ainsi être utilisées comme un biomarqueur précoce de la pathologie tau.

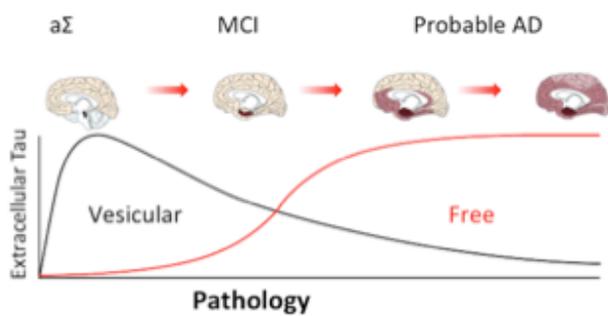


Figure 69 : Hypothèse de travail. Dans les stades asymptomatiques de la MA, la protéine tau se trouverait majoritairement sous forme vésiculaire alors qu'avec l'évolution de la pathologie et la mort neuronale, la protéine tau serait davantage présente sous forme libre.

Dans le cadre de cette étude, les patients sont recrutés à l'hôpital par des neurologues selon des critères précis d'inclusions et d'exclusions (tableaux 4 et 5, Annexe pages 201 à 202). Après recueil de leur consentement, du LCS et du sang sont prélevés et directement analysés dans notre laboratoire. Les fluides sont centrifugés pour éliminer les cellules, puis purifiés par SEC avant congélation. Cela permet de séparer les VEs des protéines libres, sans risquer que la congélation n'altère les VEs et que leur contenu ne se retrouve dans les fractions protéiques. De cette manière, nous pouvons comparer de façon fiable le ratio de protéines tau présentes sous forme vésiculaire et sous forme libre à différents stades. À l'heure actuelle, le recrutement des patients est encore en cours (tableau 2 page 61 pour le nombre actuel d'inclusions).

Les premières données obtenues sont les concentrations vésiculaires dans les différents fluides. Ces analyses sont faites le jour du prélèvement, avant la congélation des VEs. Pour le LCS, la concentration vésiculaire pour chaque patient (figure 70, A), la distribution vésiculaire moyenne en fonction de la taille pour chaque groupe (figure 70, B) et la répartition en taille moyenne des VEs dans chaque groupe (figure 70, C) sont obtenues par NTA. La concentration vésiculaire n'est pas significativement différente entre les groupes. Les distributions en taille sont également semblables et environ la moitié des VEs sont inférieures à 100 nm. La présence ou non d'une pathologie ne semble pas modifier la distribution vésiculaire globale dans le LCS humain.

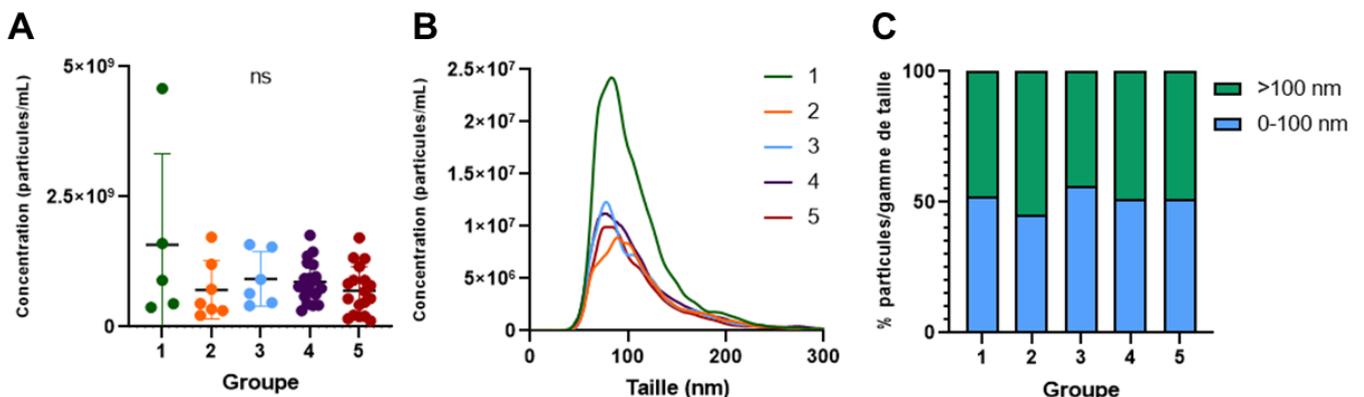


Figure 70 : Distribution vésiculaire dans le LCS des sujets de la cohorte ecTAUsome. (A) Concentration vésiculaire individuelle en fonction du groupe d'inclusion. (B) Profil moyen par groupe de la concentration vésiculaire en fonction de la taille. (C) Répartition en taille moyenne par groupe des vésicules avec un cut-off de 100 nm. Groupes : $n_1=5$; $n_2=7$; $n_3=6$; $n_4=22$; $n_5=19$. ANOVA à un facteur : $p>0,05$, ns : non significatif.

Toutefois, il est intéressant de regarder le profil de chaque patient. Le groupe 2 a été pris comme exemple ici car il regroupe 7 sujets à l'heure actuelle. La distribution vésiculaire en fonction de la taille (**figure 71, A**) et la répartition en taille des VEs (**figure 71, B**) pour chaque sujet sont obtenues par NTA. Nous pouvons observer une hétérogénéité marquée au sein d'un même groupe, ce qui soulève l'existence d'un grand nombre de facteurs qui pourraient faire varier la concentration vésiculaire globale dans le LCS.

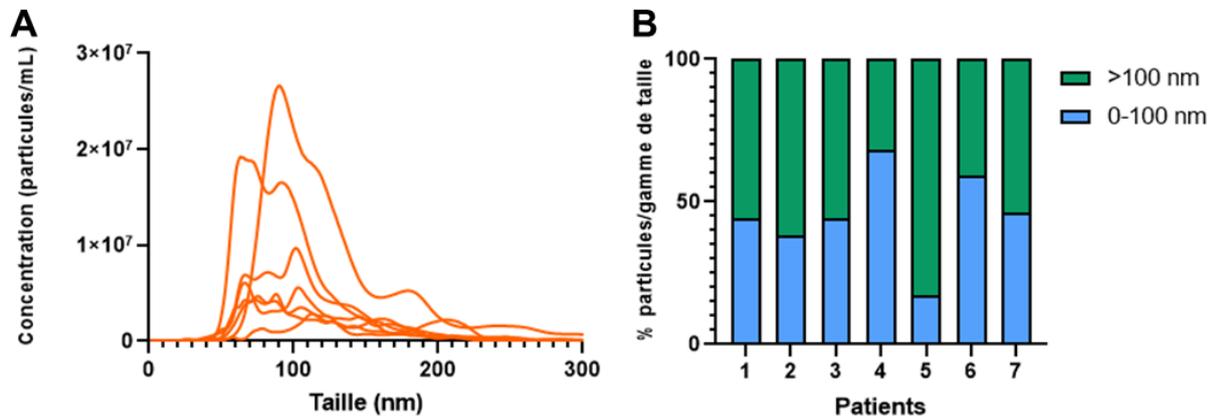


Figure 71 : Hétérogénéité de la distribution vésiculaire dans le LCS au sein du groupe 2. (A) Concentration vésiculaire en fonction de la taille par patient. (B) Répartition des vésicules par taille avec un cut-off de 100 nm pour chaque patient. n=7

Dans le plasma, la concentration vésiculaire pour chaque patient (**figure 72, A**), la distribution vésiculaire moyenne en fonction de la taille pour chaque groupe (**figure 72, B**) et la répartition en taille moyenne des VEs dans chaque groupe (**figure 72, C**) sont obtenues par NTA. La concentration vésiculaire n'est pas significativement différente entre les groupes. Toutefois, comme pour le LCS, elle est hétérogène entre les individus d'un même groupe. Les distributions sont semblables, en revanche la répartition moyenne en taille des VEs diffère selon les groupes, allant de 50 % à 90% de VEs inférieures à 100 nm. Si nous comparons le groupe contrôle (1) avec le groupe MA (5), il semblerait que la présence d'une pathologie ne modifie pas la distribution vésiculaire globale dans le plasma humain.

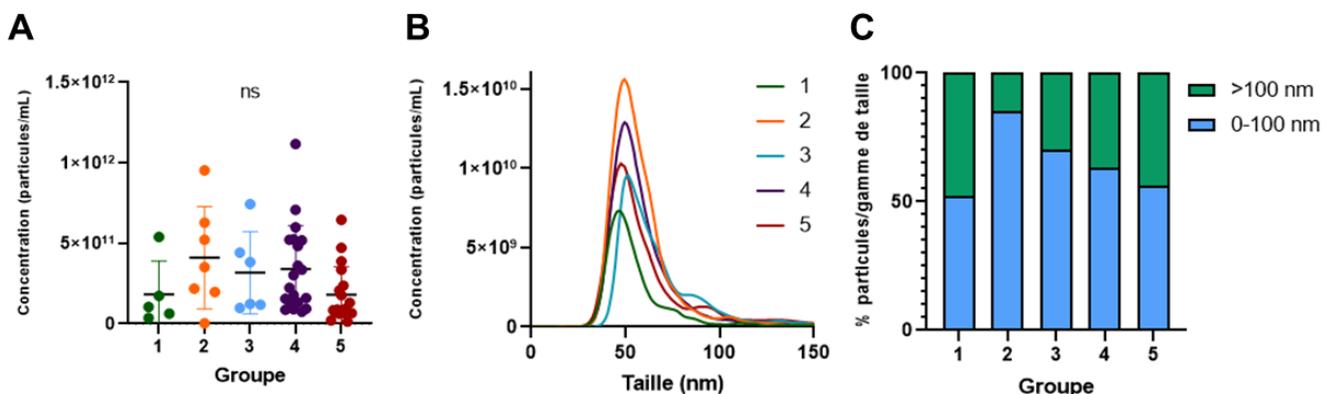


Figure 72 : Distribution vésiculaire dans le plasma des sujets de la cohorte ectAUsome. (A) Concentration vésiculaire individuelle en fonction du groupe d'inclusion. (B) Profil moyen par groupe de la concentration vésiculaire en fonction de la taille. (C) Répartition en taille moyenne par groupe des vésicules avec un cut-off de 100 nm. Groupes : $n_1=5$; $n_2=7$; $n_3=6$; $n_4=21$; $n_5=19$. ANOVA à un facteur : $p > 0,05$, ns : non significatif.

Une fois encore, il est intéressant de regarder le profil de chaque patient. Le groupe 2 a été pris comme exemple. La distribution vésiculaire en fonction de la taille (**figure 73, A**) et la répartition en taille des VEs (**figure 73, B**) pour chaque sujet sont obtenues par NTA. Elles soulèvent une nouvelle fois l'hétérogénéité au sein d'un même groupe. Toutefois, nous pouvons remarquer que chez la majorité des sujets, près de 90% des VEs analysées sont inférieures à 100 nm. Il est important de rappeler que la technique de SEC ne permet pas de se débarrasser des lipoprotéines présentes dans le plasma et que les analyses par NTA prennent en compte ces particules. Il faut donc être vigilant quant aux conclusions faites sur la concentration vésiculaire dans le plasma car elle est surestimée à cause de la présence de ces lipoprotéines.

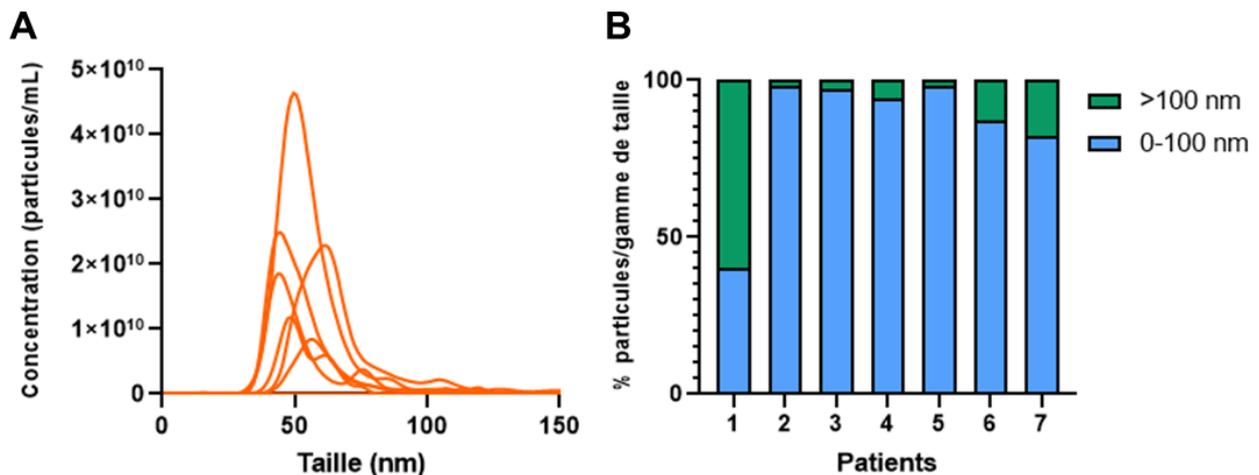


Figure 73 : Hétérogénéité de la distribution vésiculaire dans le plasma au sein du groupe 2. (A) Concentration vésiculaire en fonction de la taille par patient. **(B)** Répartition des vésicules par taille avec un cut-off de 100 nm pour chaque patient. n=7

Le dosage de tau dans le LCS total est réalisé facilement par ELISA, notamment dans le cadre du diagnostic (Hock et al., 1995; M. Leroy et al., 2021). Toutefois, sa concentration dans les VEs et dans le plasma est plus faible que dans le LCS total ce qui nécessite d'utiliser des technologies plus sensibles que l'ELISA pour sa détection, comme le Simoa® dont la sensibilité peut atteindre le fg/mL (Z. Chen et al., 2019; Foiani et al., 2018; Mielke et al., 2018; Pase et al., 2019). Une fois les recrutements terminés, les dosages de tau et ptau dans les VEs et les fractions libres seront faits en même temps, sur les mêmes lots d'anticorps et de réactifs à l'aide de la technologie Simoa®. Cela permettra d'apprécier les différences entre les 5 groupes et de corrélérer ces dosages à la concentration vésiculaire et aux données cliniques. Des premières mises au point ont été réalisées, en collaboration avec l'équipe du Dr. Sylvain Lehmann et Pr. Christophe Hirtz du laboratoire de biochimie et de protéomique clinique de Montpellier, avec le kit Neurology 4-Plex A utilisant la technologie Simoa®. Les dosages de tau sont représentés sur la **figure 74**. Ils permettent de confirmer la présence de tau dans les VEs aussi bien dans le LCS que dans le plasma.

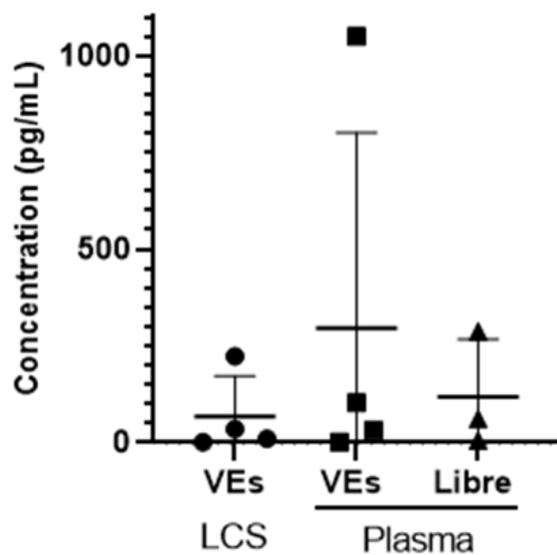


Figure 74 : Concentration en protéines tau totales chez des sujets MA. Les dosages ont été réalisés par Simoa® dans les VEs ou les fractions libres concentrées après isolation par SEC à partir de 1,5 mL de LCS (n=4) ou de plasma congelés (n=4) de patients MA.

Discussion - Conclusion

Dans cette partie, nous avons pu montrer que le LCS et le plasma contiennent des VEs. Dans des souris transgéniques développant des dépôts amyloïdes, le nombre de VEs dans le LCS diminue au cours du vieillissement (Yuyama et al., 2015). De plus, chez des patients atteints de démence (MA, DFT), la concentration vésiculaire plasmatique est également réduite comparativement aux sujets contrôles (Longobardi et al., 2021). Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas observé de diminution de la concentration vésiculaire dans les fluides périphériques entre les différents groupes d'individus. De plus, la distribution par taille des VEs n'est pas spécifique selon les groupes. Elle reflète plutôt une hétérogénéité entre les sujets qui semble indépendante de la MA. De nombreux facteurs comme l'état de santé global, le niveau de stress, l'alimentation, la qualité du sommeil, ou encore le moment du prélèvement pourraient faire varier la concentration vésiculaire. Il est également important de prendre en considération la co-isolation de lipoprotéines dans les VEs plasmatiques pour l'interprétation des données. En effet, il est décrit qu'environ 1000 fois plus de lipoprotéines que de VEs sont présentes dans le plasma (Deun et al., 2020). Le développement de nouvelles techniques de séparation comme la chromatographie bi-modale, semble prometteur pour isoler les VEs des lipoprotéines dans le plasma. Cette dernière est basée sur une double séparation, d'abord par taille puis par charge, permettant ainsi d'éliminer les particules chargées positivement comme les lipoprotéines (Deun et al., 2020).

La présence de VEs contenant des espèces pro-nucléantes de tau dans le fluide cérébral humain et celle de VEs dans les fluides périphériques nous ont amenés à nous demander si ces dernières pouvaient provenir du fluide cérébral et contenir des espèces pro-nucléantes de tau. La détection d'espèces pro-nucléantes précédant celle des marqueurs de phosphorylation, de conformation anormale et de DNF dans le cerveau (Holmes et al., 2014; Kaufman et al., 2017), il se pourrait que la détection de ces espèces dans les fluides périphériques puisse servir de biomarqueur précoce, permettant ainsi d'établir un diagnostic avant l'apparition des premiers symptômes. Nous avons évalué la présence de ces espèces à l'aide d'un modèle cellulaire de nucléation basé sur le FRET (Holmes et al., 2014). Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les VEs de LCS et de plasma de patients MA. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette absence de détection :

- Tout d'abord, la présence de lipoprotéines avec les VEs plasmatiques pourrait interférer avec le test FRET. De plus, la concentration vésiculaire dans les fluides périphériques est plus faible que celle du fluide cérébral dans lequel nous avons mis en évidence la présence d'espèces pro-nucléantes. De ce fait, si des espèces pro-nucléantes sont présentes en périphérie, elles le seraient en plus faible quantité. La sensibilité du modèle FRET pourrait donc être une limite à la détection de ces espèces. Néanmoins, ce modèle a récemment été amélioré et est décrit comme 100 fois plus sensible que celui que nous avons utilisé (Hitt et al., 2021). Pour autant, la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans le LCS de patients MA n'a pas pu être mise en évidence (Hitt et al., 2021). Des données allant dans le sens opposé ont pourtant été publiées. Des espèces pro-nucléantes de tau ont en effet été détectées, à l'aide du même modèle que nous avons utilisé, dans le LCS de patients contenant des espèces de hauts poids moléculaires de tau (Takeda et al., 2016). Une autre étude montre que l'injection de LCS de patients MA et MCI dans l'hippocampe de jeunes souris surexprimant la protéine tau humaine mutée P301S entraîne une augmentation de

l'hyperphosphorylation de tau et des DNF dans l'hippocampe et les régions connectées après 4 mois (Skachokova et al., 2019). L'amplification *in vitro* par RT-QuIC de tau a également permis de mettre en évidence la présence d'espèces pro-nucléantes dans le LCS de patients atteints de tauopathies 3R, 4R et 3R+4R (Carlomagno et al., 2021; Saijo et al., 2017, 2020). Cependant, plusieurs études en spectrométrie de masse rapportent la présence des régions N-terminale et centrale dans le LCS mais pas des domaines de répétition (Barthélemy, Fenaille, et al., 2016; Cicognola et al., 2019; Sato et al., 2018). Ces domaines forment pourtant le cœur des filaments et des oligomères (Fitzpatrick et al., 2017) et les hexapeptides semblent essentiels pour entraîner une nucléation de tau (Bergen et al., 2000, 2001). Toutefois, une étude récente rapporte que le LCS de patients MA contient des fragments dans les domaines de répétition (Horie et al., 2021). Ces données appuient l'idée que des espèces pro-nucléantes pourraient être présentes dans le LCS des patients. Les techniques utilisées dans la recherche et le diagnostic du prion comme l'amplification cyclique de repliement incorrect des protéines (PMCA) sont en cours de développement pour tau et pourraient permettre de pallier aux limites de sensibilité des modèles actuels pour la détection d'espèces pro-nucléantes dans les fluides périphériques.

- De plus, dans la première partie de ce projet, nous disposons uniquement de 500 µL de LCS et de plasma pour chaque sujet. Nous n'avons donc pas pu quantifier la concentration en protéines tau dans les VEs et nous ne savons donc pas si elles en contenaient, d'autant plus que nous avons travaillé à partir de fluide congelé. La congélation pouvant altérer les VEs (Y. Cheng et al., 2019), il est possible qu'une partie des protéines contenues initialement dans les VEs se soit retrouvée dans les fractions libres. Ces fractions n'ont malheureusement pas été analysées. Les échantillons de la cohorte ecTAUosome vont permettre de pallier à ces limites puisque les VEs sont isolées avant la congélation, que nous avons conservé les fractions libres pour les comparer aux fractions vésiculaires et que nous disposons de plus de matériel pour pouvoir quantifier la concentration en protéines tau et réaliser d'autres analyses. Les premières mises au point avec la technologie Simoa® semblent confirmer que la protéine tau est bien présente dans les VEs. Le plasma nécessite en effet l'utilisation de techniques très sensibles car les VEs cérébrales se retrouvent potentiellement diluées parmi les VEs libérées par les autres cellules du corps humain.
- Enfin, il est également possible que les espèces pro-nucléantes qui participent à la propagation de la pathologie tau ne soient pas drainées dans le LCS ou ne passent pas la BHE. Les mécanismes permettant leur passage ne sont d'ailleurs pas encore clairement élucidés (Saint-Pol et al., 2020). Toutefois, une altération de la BHE ainsi qu'une neuroinflammation et une altération du système glymphatique en lien avec des troubles du sommeil sont discutées dans la MA (Jessen et al., 2015; Leng & Edison, 2021; Montagne et al., 2016). Elles pourraient faciliter l'évasion des protéines et des VEs du cerveau. L'apparition chronologique de ces événements n'est cependant pas claire. Il est possible qu'ils apparaissent assez tardivement avec l'évolution de la pathologie, limitant ainsi le passage précoce des VEs et des protéines en général dans les fluides périphériques. Cela souligne une nouvelle fois la nécessité de développer des technologies de plus en plus sensibles pour l'identification de biomarqueurs précoces de la MA. Dans le LCS néanmoins, la protéine tau sous forme libre est facilement détectable par ELISA alors que sa détection sous forme vésiculaire nécessite des technologies plus sensibles comme le Simoa®. Il est donc également envisageable que les formes libres soient drainées dans le LCS, mais pas les VEs.

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

PERSPECTIVES

1. Décrypter l'identité des VEs et des espèces pro-nucléantes de tau impliquées dans la propagation de la pathologie tau

En étudiant les VEs issues de fluide cérébral humain, nous avons cherché à savoir si elles pouvaient être impliquées dans la propagation des tauopathies sporadiques (MA, PSP et Pick). Nous avons montré qu'elles contiennent en effet des espèces pro-nucléantes de tau capables de potentialiser *in vivo* la pathologie dans un modèle transgénique murin de tauopathie. Dans le but de développer un outil thérapeutique bloquant la propagation de la pathologie tau, il est important d'identifier une cible thérapeutique, qui pourrait se trouver à la surface des VEs. Toutefois, pour l'identifier il est d'abord nécessaire d'identifier les sous-populations vésiculaires qui transportent les espèces de tau responsables de la propagation de la pathologie. Les perspectives de ce projet sont donc de décrypter l'identité de ces VEs et cela nécessite d'identifier (1) leur voie de biogénèse, (2) leur origine cellulaire, (3) l'identité des espèces pro-nucléantes et enfin, (4) un marqueur spécifique des VEs à cibler.

(1). Nous avons commencé à investiguer indirectement les voies de biogénèse des VEs contenant des espèces pro-nucléantes de tau via la séparation des petites et des grandes VEs. En effet, les petites VEs étant davantage associées aux exosomes et les grandes aux microparticules (Cocucci & Meldolesi, 2015; van Niel et al., 2018), nous avons fait le choix de cette séparation en fonction de la taille. Nous avons pu mettre en évidence par analyse protéomique des profils différents entre ces deux populations, appuyant l'idée qu'il s'agit bien de populations vésiculaires distinctes. Toutefois, aucune donnée ne nous permet actuellement de valider leur voie de biogénèse et nous savons qu'il existe un recouvrement en taille entre les exosomes et les microparticules (Mathieu et al., 2019). La pertinence de cette séparation pour l'identification des VEs d'intérêt reste donc discutable.

(2). Les VEs isolées à partir de fluide cérébral sont issues aussi bien des neurones que des cellules gliales, comme le montrent nos données de protéomique ainsi que celles d'une étude récente (Muraoka et al., 2020). Comme décrit précédemment, l'identification de marqueurs vésiculaires propres à chaque type cellulaire permettra d'isoler séparément les VEs neuronales et gliales par immunocapture et ainsi étudier leur capacité de nucléation dans le modèle de FRET. Cela servira à ouvrir des pistes sur les mécanismes de transfert des espèces pro-nucléantes selon les tauopathies. En effet, les cellules affectées par la pathologie tau diffèrent en fonction des tauopathies. Nos premières données de protéomique nous permettent de commencer à apprécier les différences entre les VEs issues de fluide cérébral de sujets contrôles et de patients MA bien qu'elles ne soient pas réalisées uniquement sur les VEs contenant les espèces pro-nucléantes de tau. Afin de mieux comprendre l'origine des VEs responsables de la propagation, une étude protéomique à plus grande échelle des VEs issues de fluide cérébral de patients MA à différents stades de Braak, de patients PSP, de patients Pick et des sujet contrôles a été initiée en collaboration avec le Dr. Kévin Richetin à Lausanne. Cette étude a pour but d'examiner les différentes signatures protéiques des VEs en fonction des patients et de l'avancée de la pathologie, mais aussi d'identifier des marqueurs vésiculaires en fonction des origines cellulaires.

(3). Les espèces de tau responsables de la propagation ne sont pas encore clairement identifiées même si plusieurs études ont été menées pour examiner le rôle de la phosphorylation, de la troncation, des oligomères, des espèces de haut poids moléculaire, etc. (Pernègre et al., 2019). Selon les études, toutes les tailles moléculaires de la protéine tau semblent avoir la capacité d'entraîner la nucléation des protéines tau solubles intracellulaires (Mirbaha et al., 2018; Mudher et al., 2017). Cependant, il est essentiel de réussir à comprendre lesquelles sont réellement impliquées dans la propagation de la pathologie tau dans le cerveau humain. Les différences biochimiques, lésionnelles et d'évolution spatio-temporelle entre les tauopathies (Colin et al., 2020), ainsi que nos résultats, appuient l'existence d'espèces pro-nucléantes de tau différentes selon la tauopathie considérée. Afin d'identifier la nature des espèces de tau présentes dans les VEs de fluide cérébral de patients atteints de MA, de PSP et de Pick ainsi que des sujets contrôles, une étude protéomique ciblée sur la protéine tau a été initiée en collaboration avec l'équipe du Dr. Sylvain Lehmann et du Pr. Christophe Hirtz à Montpellier. Elle permettra de mettre en évidence les différentes modifications post-traductionnelles, les troncations et les ratios d'isoformes de protéines tau présentes dans les VEs en fonction des tauopathies. Nous espérons ainsi identifier des espèces spécifiques à chaque pathologie qui pourraient être impliquées dans la propagation. Leur identification permettra de les étudier individuellement et de valider leur activité de nucléation dans le modèle FRET.

(4). Une fois que l'identité des VEs et des espèces pro-nucléantes de tau sera décryptée, il sera possible d'identifier un marqueur spécifique aux VEs impliquées dans la propagation. Ce marqueur pourrait servir de cible thérapeutique pour, par exemple, le développement d'immunothérapie neutralisant les VEs impliquées dans la propagation. Le but étant ici de bloquer la propagation de la pathologie tau. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que dans la MA, les lésions liées aux peptides A β sont aussi présentes et qu'elles semblent potentialiser la pathologie tau (Bennett et al., 2017; Clayton et al., 2021; Gomes et al., 2019; He et al., 2018; Lam et al., 2021; G. A. Rodriguez et al., 2020). Un anticorps monoclonal anti-A β , l'aducanumab, vient d'ailleurs d'obtenir une autorisation de mise sur le marché par la FDA (*Food and Drug Administration* aux États-Unis) pour le traitement de la MA (www.fda.gov). Le réel bénéfice clinique est cependant encore controversé (Knopman et al., 2021). Nous pouvons donc imaginer qu'une combinaison de traitements sera nécessaire pour ralentir voire stopper la progression de la MA. Au-delà de l'aspect thérapeutique, les différentes signatures protéiques et lipidiques vésiculaires aideraient à mieux comprendre la vulnérabilité cellulaire associée aux différentes tauopathies. En effet, nous avons émis l'hypothèse que, selon les ligands présents à la surface des VEs, elles pourraient cibler spécifiquement certaines sous-populations cellulaires présentant les récepteurs appropriés. Cet aspect sera susceptible d'être étudié plus amplement à la suite de l'injection de sous-populations vésiculaires différentes dans le cerveau de souris et l'examen des voies de propagation affectées. Le transfert de ces VEs sur des cultures de tranches organotypiques de cerveaux de souris permettrait également d'identifier des sous-populations cellulaires plus vulnérables.

Enfin, il est important de souligner à nouveau l'existence d'une hétérogénéité importante entre les patients atteints d'une même tauopathie. Cela a notamment été clairement mis en évidence dans la MA (Dujardin et al., 2020; Neff et al., 2021). Plusieurs sous-types moléculaires de MA correspondant à différentes combinaisons de voies dérégulées (neuroinflammation, signalisation synaptique, activité immunitaire, système mitochondrial, myélinisation, etc.) ont été mis en évidence (Neff et al., 2021). Face à ces évidences, un débat s'est ouvert sur le fait de

parler non plus de « la » maladie d'Alzheimer mais « des » maladies d'Alzheimer. Les différents sous-types ou maladies, selon les avis, expliqueraient en partie l'hétérogénéité des réponses aux traitements dans les essais cliniques. Comprendre cette hétérogénéité entraînerait une meilleure inclusion des patients dans les essais et ainsi une meilleure évaluation de l'efficacité d'un traitement. Ils peuvent aussi expliquer pourquoi certains traitements s'avèrent très efficaces dans les modèles animaux de tauopathies mais pas chez les patients. Démêler les processus moléculaires responsables de cette hétérogénéité ainsi que leurs conséquences est essentiel pour proposer une médecine personnalisée à chaque patient et ainsi augmenter l'efficacité des réponses aux traitements.

2. À la recherche de biomarqueurs dans les VEs des fluides périphériques

Afin de proposer un traitement le plus précocement possible et ainsi maximiser les chances de stopper la progression des tauopathies, il est essentiel de diagnostiquer les patients avant même l'apparition des premiers symptômes. Pour cela, de nombreuses équipes sont à la recherche de biomarqueurs précoces, fiables et spécifiques à une maladie. Avec toutes les nouvelles connaissances acquises sur les VEs, ces dernières prennent une place de plus en plus importante dans la recherche de biomarqueurs (Gámez-Valero et al., 2019; Hoshino et al., 2020; Pang et al., 2020). Les protéines et les acides nucléiques qu'elles transportent pourraient servir de biomarqueurs mais aussi permettre d'identifier une bio-signature spécifique à une maladie. En collaboration avec l'équipe du Dr. Sylvain Lehmann et du Pr. Christophe Hirtz à Montpellier, nous allons identifier, par analyse protéomique, les espèces de tau présentes dans les VEs de LCS et de plasma de patients MA et de sujets contrôles. Des analyses des protéines libres isolées à partir des mêmes échantillons et des VEs de fluide cérébral seront utilisées pour comparer les différentes espèces de tau identifiées. Cela permettra de mieux comprendre quelles sont les espèces uniquement présentes dans le cerveau et celles capables de rejoindre les fluides périphériques. La comparaison entre les sujets sains et les patients devrait aider à identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels dans les fluides périphériques.

Enfin, nos travaux et ceux d'autres équipes (Hitt et al., 2021) n'ont pas permis de mettre en évidence la présence d'espèces pro-nucléantes de tau dans les fluides périphériques, qui aurait pu servir de biomarqueur. Toutefois, leur concentration est peut-être trop faible pour être détectée par les techniques actuelles. C'est pourquoi nous cherchons à mettre au point, en collaboration avec le Dr. Daisy Bougard de l'Établissement Français du Sang de Montpellier, la technique PMCA (pour *Protein Misfolding Cyclic Amplification*) initialement développée pour la détection du prion PrPSc (**figure 75**). Cela permettra d'amplifier les espèces pro-nucléantes de tau dans les fluides biologiques, si elles sont présentes, et de déterminer leur nature par spectrométrie de masse.

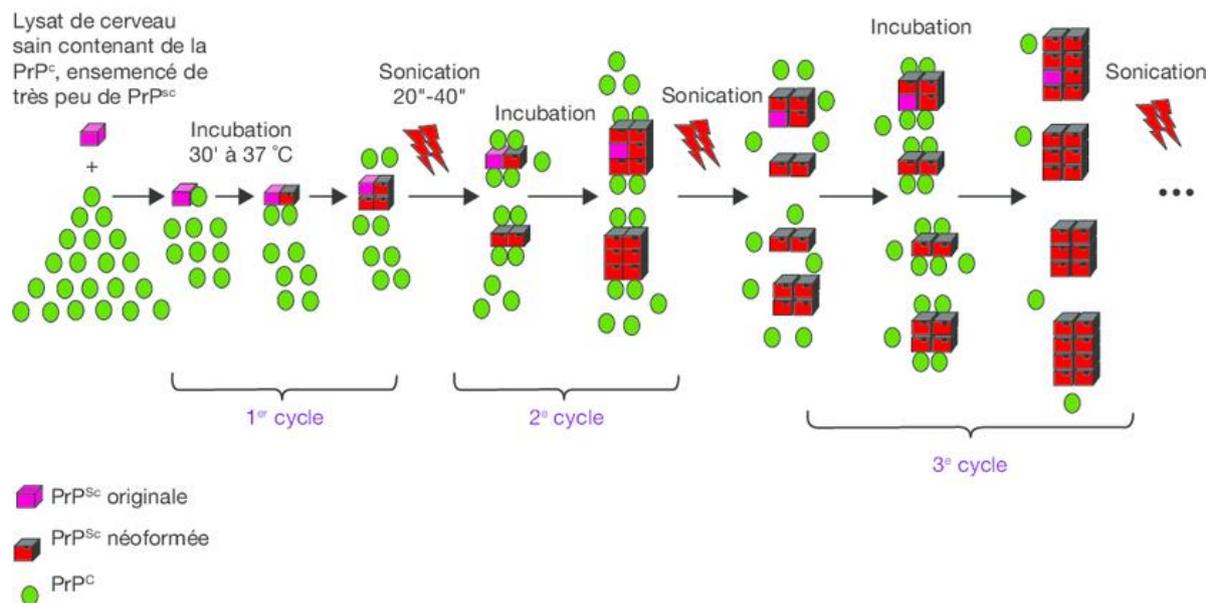


Figure 75 : Représentation schématique du principe de la PMCA développée pour le diagnostic des maladies à prions. Un lysat de cerveau sain contenant de la PrP^C est incubé avec une très faible quantité de PrP^{Sc}. L'amplification cyclique consiste à alterner des cycles d'incubation à 37 °C, permettant la conversion et la polymérisation des PrP^C en PrP^{Sc}, et des cycles de sonication, permettant de fragmenter les assemblages formés en noyaux disponibles pour la conversion des PrP^C encore présentes. Moudjou & Ermonval, 2010.

CONCLUSION

À travers ce travail de thèse, nous avons pu montrer, chez des patients atteints de tauopathies et particulièrement de la maladie d'Alzheimer, que les VEs sont capables de transporter des espèces pro-nucléantes de tau impliquées dans la transmission de la pathologie *in vivo*. Nos données supportent donc l'hypothèse d'une propagation de type prion de la pathologie tau médiée par les VEs. Cette voie de sécrétion est maintenant largement acceptée comme faisant partie intégrante de la communication intercellulaire, notamment car elle permet l'échange de protéines bioactives entre les cellules. Ainsi, nos travaux soulignent l'importance de comprendre comment la pathologie tau se propage dans le cerveau selon les tauopathies afin de concevoir des outils thérapeutiques spécifiques et adaptés pour bloquer cette propagation. Maintenant que nous commençons à apprécier la diversité des VEs, il faut chercher à identifier celles qui sont spécifiquement liées à la propagation des tauopathies. En effet, les VEs étant impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques, dont il reste beaucoup à découvrir, il n'est pas envisageable de bloquer totalement la sécrétion vésiculaire. Il est donc essentiel d'identifier un marqueur spécifique à ces VEs ainsi que la nature des espèces pro-nucléantes de tau responsables de la propagation. De plus, l'identification des VEs transportant ces espèces permettra également de mieux comprendre la vulnérabilité cellulaire propre à chaque tauopathie.

Nos travaux confirment également l'hétérogénéité entre les tauopathies mais aussi au sein des tauopathies. Ils permettent de mieux apprécier les données déjà connues sur l'hétérogénéité des lésions et leur progression spatio-temporelle ainsi que l'hétérogénéité clinique. Il convient de rappeler que le cerveau est un organe très complexe qui gouverne un système intégré tout aussi complexe : le corps humain. Le vécu physique et psychologique de chaque individu ainsi que son patrimoine génétique contribuent à rendre chaque cerveau unique et plus ou moins vulnérable aux pathologies. De plus en plus d'études d'imagerie cérébrale, de génétique, d'immunologie, de biologie fondamentale, etc., permettent d'apprécier cette hétérogénéité et conduisent à repenser la médecine occidentale en faveur d'une médecine plus personnalisée.

En conclusion, ces travaux ont mis en lumière le rôle des VEs comme actrices de la propagation de la pathologie tau chez l'Homme et non plus uniquement dans des modèles animaux transgéniques. Ils ouvrent la voie à de nombreuses autres études qui conduiront à mieux caractériser les VEs et à comprendre les voies de propagation de la pathologie tau et la vulnérabilité cellulaire associée. Le but est de pouvoir proposer des outils thérapeutiques aux patients qui ralentissent voir stoppent complètement la progression clinique des tauopathies.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abbott, N. J. (2004). Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid : Significance for physiology and pathology. *Neurochemistry International*, 45(4), 545-552. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.11.006>

Abounit, S., Wu, J. W., Duff, K., Victoria, G. S., & Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes : A possible highway in the spreading of tau and other prion-like proteins in neurodegenerative diseases. *Prion*, 10(5), 344-351. <https://doi.org/10.1080/19336896.2016.1223003>

Adams, S. J., DeTure, M. A., McBride, M., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2010). Three Repeat Isoforms of Tau Inhibit Assembly of Four Repeat Tau Filaments. *PLOS ONE*, 5(5), e10810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010810>

Ahmed, Z., Cooper, J., Murray, T. K., Garn, K., McNaughton, E., Clarke, H., Parhizkar, S., Ward, M. A., Cavallini, A., Jackson, S., Bose, S., Clavaguera, F., Tolnay, M., Lavenir, I., Goedert, M., Hutton, M. L., & O'Neill, M. J. (2014). 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 Neuropathologica*, 127(5), 667-683. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1254-6>

Albert, M., Mairet-Coello, G., Danis, C., Lieger, S., Caillierez, R., Carrier, S., Skrobala, E., Landrieu, I., Michel, A., Schmitt, M., Citron, M., Downey, P., Courade, J.-P., Buée, L., & Colin, M. (2019). Prevention of tau seeding and propagation by immunotherapy with a central tau epitope antibody. *Brain*, 142(6), 1736-1750. <https://doi.org/10.1093/brain/awz100>

Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M. J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P. C., Atzori, C., Migheli, A., Crowther, R. A., Ghetti, B., Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), 9340-9351.

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, 10(5), 619-624. <https://doi.org/10.1038/ncb1725>

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, 64, 146-8.

Anderson, J. M., Hampton, D. W., Patani, R., Pryce, G., Crowther, R. A., Reynolds, R., Franklin, R. J. M., Giovannoni, G., Compston, D. a. S., Baker, D., Spillantini, M. G., & Chandran, S. (2008). Abnormally phosphorylated tau is associated with neuronal and axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 131(Pt 7), 1736-1748. <https://doi.org/10.1093/brain/awn119>

Andreadis, A. (2012). Tau Splicing and the Intricacies of Dementia. *Journal of Cellular Physiology*, 227(3), 1220-1225. <https://doi.org/10.1002/jcp.22842>

- Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., Novellino, L., Clementi, E., Giussani, P., Viani, P., Matteoli, M., & Verderio, C. (2012).** Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *The EMBO Journal*, *31*(5), 1231-1240. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.489>
- Antonyak, M. A., Li, B., Boroughs, L. K., Johnson, J. L., Druso, J. E., Bryant, K. L., Holowka, D. A., & Cerione, R. A. (2011).** Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(12), 4852-4857. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017667108>
- Aoyagi, H., Hasegawa, M., & Tamaoka, A. (2007).** Fibrillogenic Nuclei Composed of P301L Mutant Tau Induce Elongation of P301L Tau but Not Wild-type Tau *. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(28), 20309-20318. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611876200>
- Arai, H., Terajima, M., Miura, M., Higuchi, S., Muramatsu, T., Machida, N., Seiki, H., Takase, S., Clark, C. M., & Lee, V. M. (1995).** Tau in cerebrospinal fluid: A potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, *38*(4), 649-652. <https://doi.org/10.1002/ana.410380414>
- Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016).** Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*, *126*, 238-292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
- Arima, K. (2006).** Ultrastructural characteristics of tau filaments in tauopathies: Immunoelectron microscopic demonstration of tau filaments in tauopathies. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, *26*(5), 475-483. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2006.00669.x>
- Arrasate, M., Pérez, M., & Avila, J. (2000).** Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochemical Research*, *25*(1), 43-50. <https://doi.org/10.1023/a:1007583214722>
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992).** Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, *42*(3 Pt 1), 631-639. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.3.631>
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., Wolozin, B., Butovsky, O., Kügler, S., & Ikezu, T. (2015).** Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nature Neuroscience*, *18*(11), 1584-1593. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>
- Ashton, N. J., Pascoal, T. A., Karikari, T. K., Benedet, A. L., Lantero-Rodriguez, J., Brinkmalm, G., Snellman, A., Schöll, M., Troakes, C., Hye, A., Gauthier, S., Vanmechelen, E., Zetterberg, H., Rosa-Neto, P., & Blennow, K. (2021).** Plasma p-tau₂₃₁: A new biomarker for incipient Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathologica*, *141*(5), 709-724. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02275-6>

B

Baker, S., Polanco, J. C., & Götz, J. (2016). Extracellular Vesicles Containing P301L Mutant Tau Accelerate Pathological Tau Phosphorylation and Oligomer Formation but Do Not Seed Mature Neurofibrillary Tangles in ALZ17 Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, *54*(3), 1207-1217. <https://doi.org/10.3233/JAD-160371>

Barghorn, S., & Mandelkow, E. (2002). Toward a Unified Scheme for the Aggregation of Tau into Alzheimer Paired Helical Filaments. *Biochemistry*, *41*(50), 14885-14896. <https://doi.org/10.1021/bi026469j>

Barghorn, S., Zheng-Fischhöfer, Q., Ackmann, M., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2000). Structure, Microtubule Interactions, and Paired Helical Filament Aggregation by Tau Mutants of Frontotemporal Dementias. *Biochemistry*, *39*(38), 11714-11721. <https://doi.org/10.1021/bi000850r>

Barini, E., Plotzky, G., Mordashova, Y., Hoppe, J., Rodriguez-Correa, E., Julier, S., LePriault, F., Mairhofer, I., Mezler, M., Biesinger, S., Cik, M., Meinhardt, M. W., Ercan-Herbst, E., Ehrnhoefer, D. E., Striebinger, A., Bodie, K., Klein, C., Gasparini, L., & Schlegel, K. (2021). Tau in the brain interstitial fluid is fragmented and seeding-competent. *BioRxiv*, 2020.07.15.205724. <https://doi.org/10.1101/2020.07.15.205724>

Barini, E., Plotzky, G., Mordashova, Y., Hoppe, J., Rodriguez-Correa, E., Julier, S., LePriault, F., Mairhofer, I., Mezler, M., Biesinger, S., Cik, M., Meinhardt, M. W., Ercan-Herbst, E., Ehrnhoefer, D., Striebinger, A., Bodie, K., Klein, C., Gasparini, L., & Schlegel, K. (2020). *Tau in the brain interstitial fluid is fragmented and seeding-competent* [Preprint]. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/2020.07.15.205724>

Baron, M., Boulanger, C. M., Staels, B., & Tailleux, A. (2012). Cell-derived microparticles in atherosclerosis : Biomarkers and targets for pharmacological modulation? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(7), 1365-1376. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01486.x>

Barthélemy, N. R., Fenaille, F., Hirtz, C., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., Vialaret, J., Buée, L., Gabelle, A., Junot, C., Lehmann, S., & Becher, F. (2016). Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity. *Journal of Proteome Research*, *15*(2), 667-676. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01001>

Barthélemy, N. R., Gabelle, A., Hirtz, C., Fenaille, F., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., Vialaret, J., Buée, L., Junot, C., Becher, F., & Lehmann, S. (2016). Differential Mass Spectrometry Profiles of Tau Protein in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease, Progressive Supranuclear Palsy, and Dementia with Lewy Bodies. *Journal of Alzheimer's Disease*, *51*(4), 1033-1043. <https://doi.org/10.3233/JAD-150962>

Beekes, M., Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W. J., & Burger, R. (2014). Is there a risk of prion-like disease transmission by Alzheimer- or Parkinson-associated protein particles? *Acta Neuropathologica*, *128*(4), 463-476. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1324-9>

- Bennett**, R. E., DeVos, S. L., Dujardin, S., Corjuc, B., Gor, R., Gonzalez, J., Roe, A. D., Frosch, M. P., Pitstick, R., Carlson, G. A., & Hyman, B. T. (2017). Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid β . *The American Journal of Pathology*, 187(7), 1601-1612. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.011>
- Berenguer**, J., Lagerweij, T., Zhao, X. W., Dusoswa, S., van der Stoop, P., Westerman, B., Gooijer, M. C. de, Zoetemelk, M., Zomer, A., Crommentuijn, M. H. W., Wedekind, L. E., López-López, À., Giovanazzi, A., Bruch-Oms, M., Meulen-Muileman, I. H. van der, Reijmers, R. M., van Kuppevelt, T. H., García-Vallejo, J.-J., van Kooyk, Y., ... Wurdinger, T. (2018). Glycosylated extracellular vesicles released by glioblastoma cells are decorated by CCL18 allowing for cellular uptake via chemokine receptor CCR8. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1446660. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1446660>
- Bergen**, M. von, Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2001). Mutations of Tau Protein in Frontotemporal Dementia Promote Aggregation of Paired Helical Filaments by Enhancing Local β -Structure *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48165-48174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105196200>
- Bergen**, M. von, Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2000). Assembly of τ protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming β structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5129-5134. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5129>
- Berger**, Z., Roder, H., Hanna, A., Carlson, A., Rangachari, V., Yue, M., Wszolek, Z., Ashe, K., Knight, J., Dickson, D., Andorfer, C., Rosenberry, T. L., Lewis, J., Hutton, M., & Janus, C. (2007). Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(14), 3650-3662. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0587-07.2007>
- Bianco**, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E. H., Furlan, R., Clementi, E., Matteoli, M., & Verderio, C. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *The EMBO Journal*, 28(8), 1043-1054. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.45>
- Binder**, L. I., Frankfurter, A., & Rebhun, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of Cell Biology*, 101(4), 1371-1378. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1371>
- Bissig**, C., & Gruenberg, J. (2014). ALIX and the multivesicular endosome : ALIX in Wonderland. *Trends in Cell Biology*, 24(1), 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.10.009>
- Blennow**, K. (2017). A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease : Moving from CSF to Blood. *Neurology and Therapy*, 6(Suppl 1), 15-24. <https://doi.org/10.1007/s40120-017-0073-9>
- Böing**, A. N., van der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 23430. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>
- Braak**, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239-259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>

- Braak**, H., & Del Tredici, K. (2011). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathologica*, 121(2), 171-181. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0789-4>
- Braak**, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E., & Del Tredici, K. (2011). Stages of the Pathologic Process in Alzheimer Disease : Age Categories From 1 to 100 Years. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 70(11), 960-969. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318232a379>
- Bradbury**, M. W., Cserr, H. F., & Westrop, R. J. (1981). Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *The American Journal of Physiology*, 240(4), F329-336. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1981.240.4.F329>
- Brandt**, R., Léger, J., & Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *The Journal of Cell Biology*, 131(5), 1327-1340. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.5.1327>
- Bright**, J., Hussain, S., Dang, V., Wright, S., Cooper, B., Byun, T., Ramos, C., Singh, A., Parry, G., Stagliano, N., & Griswold-Prenner, I. (2015). Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 693-709. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.007>
- Brion**, J. P., Couck, A. M., Passareiro, E., & Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease : An immunohistochemical study. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 17(1), 89-96.
- Brothers**, H. M., Gosztyla, M. L., & Robinson, S. R. (2018). The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00118>
- Brown**, M. S., & Goldstein, J. L. (1974). Familial hypercholesterolemia : Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(3), 788-792. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.3.788>
- Brown**, P., & Bradley, R. (1998). 1755 and all that : A historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *BMJ : British Medical Journal*, 317(7174), 1688-1692.
- Buée**, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, 36.
- Buée**, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 33(1), 95-130. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(00)00019-9)
- Buschow**, S. I., Liefhebber, J. M. P., Wubbolts, R., & Stoorvogel, W. (2005). Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(3), 398-403. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.08.005>

C

Cacace, R., Slegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *12*(6), 733-748. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.012>

Cai, Z., Qiao, P.-F., Wan, C.-Q., Cai, M., Zhou, N.-K., & Li, Q. (2018). Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *63*(4), 1223-1234. <https://doi.org/10.3233/JAD-180098>

Caillet-Boudin, M.-L., Buée, L., Sergeant, N., & Lefebvre, B. (2015). Regulation of human MAPT gene expression. *Molecular Neurodegeneration*, *10*. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0025-8>

Caillierez, R., Bégard, S., Lécolle, K., Deramecourt, V., Zommer, N., Dujardin, S., Loyens, A., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Déglon, N., Buée, L., & Colin, M. (2013). Lentiviral Delivery of the Human Wild-type Tau Protein Mediates a Slow and Progressive Neurodegenerative Tau Pathology in the Rat Brain. *Molecular Therapy*, *21*(7), 1358-1368. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.66>

Calafate, S., Buist, A., Miskiewicz, K., Vijayan, V., Daneels, G., de Strooper, B., de Wit, J., Verstreken, P., & Moechars, D. (2015). Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation. *Cell Reports*, *11*(8), 1176-1183. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043>

Calafate, S., Flavin, W., Verstreken, P., & Moechars, D. (2016). Loss of Bin1 Promotes the Propagation of Tau Pathology. *Cell Reports*, *17*(4), 931-940. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.063>

Carare, R. O., Bernardes-Silva, M., Newman, T. A., Page, A. M., Nicoll, J. a. R., Perry, V. H., & Weller, R. O. (2008). Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries : Significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *34*(2), 131-144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00926.x>

Carlomagno, Y., Manne, S., DeTure, M., Prudencio, M., Zhang, Y.-J., Hanna Al-Shaikh, R., Dunmore, J. A., Daugherty, L. M., Song, Y., Castanedes-Casey, M., Lewis-Tuffin, L. J., Nicholson, K. A., Wszolek, Z. K., Dickson, D. W., Fitzpatrick, A. W. P., Petrucelli, L., & Cook, C. N. (2021). The AD tau core spontaneously self-assembles and recruits full-length tau to filaments. *Cell Reports*, *34*(11), 108843. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108843>

Carlson, G. A., & Prusiner, S. B. (2021). How an Infection of Sheep Revealed Prion Mechanisms in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4861. <https://doi.org/10.3390/ijms22094861>

Castillo-Carranza, D. L., Gerson, J. E., Sengupta, U., Guerrero-Muñoz, M. J., Lasagna-Reeves, C. A., & Kaye, R. (2014). Specific Targeting of Tau Oligomers in Htau Mice Prevents Cognitive Impairment and Tau Toxicity Following Injection with Brain-Derived Tau Oligomeric Seeds. *Journal of Alzheimer's Disease*, *40*(s1), S97-S111. <https://doi.org/10.3233/JAD-132477>

- Cataldo**, A. M., Peterhoff, C. M., Troncoso, J. C., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T., & Nixon, R. A. (2000). Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: Differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *The American Journal of Pathology*, *157*(1), 277-286. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64538-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64538-5)
- Cazaubon**, S., Viegas, P., & Couraud, P.-O. (2007). Fonctions de la protéine prion PrPc. *médecine/sciences*, *23*(8-9), 741-745. <https://doi.org/10.1051/medsci/20072389741>
- Chai**, X., Dage, J. L., & Citron, M. (2012). Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiology of Disease*, *48*(3), 356-366. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.05.021>
- Chandra**, A., Valkimadi, P.-E., Pagano, G., Cousins, O., Dervenoulas, G., Politis, M., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2019). Applications of amyloid, tau, and neuroinflammation PET imaging to Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Human Brain Mapping*, *40*(18), 5424-5442. <https://doi.org/10.1002/hbm.24782>
- Chartier-Harlin**, M. C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., & Hardy, J. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*, *353*(6347), 844-846. <https://doi.org/10.1038/353844a0>
- Chaunu**, M.-P., Deramecourt, V., Buée-Scherrer, V., Le Ber, I., Brice, A., Ehrle, N., El Hachimi, K., Pluot, M., Maurage, C.-A., Bakchine, S., & Buée, L. (2013). Juvenile frontotemporal dementia with parkinsonism associated with tau mutation G389R. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *37*(4), 769-776. <https://doi.org/10.3233/JAD-130413>
- Chen**, C. C., Liu, L., Ma, F., Wong, C. W., Guo, X. E., Chacko, J. V., Farhoodi, H. P., Zhang, S. X., Zimak, J., Ségaliny, A., Riazifar, M., Pham, V., Digman, M. A., Pone, E. J., & Zhao, W. (2016). Elucidation of Exosome Migration Across the Blood-Brain Barrier Model In Vitro. *Cellular and Molecular Bioengineering*, *9*(4), 509-529. <https://doi.org/10.1007/s12195-016-0458-3>
- Chen**, J. J., Nathaniel, D. L., Raghavan, P., Nelson, M., Tian, R., Tse, E., Hong, J. Y., See, S. K., Mok, S.-A., Hein, M. Y., Southworth, D. R., Grinberg, L. T., Gestwicki, J. E., Leonetti, M. D., & Kampmann, M. (2019). Compromised function of the ESCRT pathway promotes endolysosomal escape of tau seeds and propagation of tau aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(50), 18952-18966. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009432>
- Chen**, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y., Zhong, M., Xu, S., Chen, C., Li, L., & Yu, Z. (2012). Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochemistry International*, *60*(3), 233-242. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.013>
- Chen**, Z., Mengel, D., Keshavan, A., Rissman, R. A., Billinton, A., Perkinton, M., Percival-Alwyn, J., Schultz, A., Properzi, M., Johnson, K., Selkoe, D. J., Sperling, R. A., Patel, P., Zetterberg, H., Galasko, D., Schott, J. M., & Walsh, D. M. (2019). Learnings about the complexity of extracellular tau aid development of a blood-based screen for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *15*(3), 487-496. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.09.010>

- Cheng, L., Zhao, W., & Hill, A. F. (2018).** Exosomes and their role in the intercellular trafficking of normal and disease associated prion proteins. *Molecular Aspects of Medicine*, *60*, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.011>
- Cheng, Y., Zeng, Q., Han, Q., & Xia, W. (2019).** Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. *Protein & Cell*, *10*(4), 295-299. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0529-4>
- Chivet, M., Javalet, C., Laulagnier, K., Blot, B., Hemming, F. J., & Sadoul, R. (2014).** Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *Journal of Extracellular Vesicles*, *3*(1), 24722. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24722>
- Christianson, H. C., Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J.-P., & Belting, M. (2013).** Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(43), 17380-17385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304266110>
- Cicognola, C., Brinkmalm, G., Wahlgren, J., Portelius, E., Gobom, J., Cullen, N. C., Hansson, O., Parnetti, L., Constantinescu, R., Wildsmith, K., Chen, H.-H., Beach, T. G., Lashley, T., Zetterberg, H., Blennow, K., & Höglund, K. (2019).** Novel tau fragments in cerebrospinal fluid : Relation to tangle pathology and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *137*(2), 279-296. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1948-2>
- Clague, M. J., Liu, H., & Urbé, S. (2012).** Governance of Endocytic Trafficking and Signaling by Reversible Ubiquitylation. *Developmental Cell*, *23*(3), 457-467. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.08.011>
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R. A., Frank, S., Hench, J., Probst, A., Winkler, D. T., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Ghetti, B., Goedert, M., & Tolnay, M. (2013).** Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(23), 9535-9540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301175110>
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A. K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., & Tolnay, M. (2009).** Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature Cell Biology*, *11*(7), 909-913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>
- Clayton, K., Delpech, J. C., Herron, S., Iwahara, N., Ericsson, M., Saito, T., Saido, T. C., Ikezu, S., & Ikezu, T. (2021).** Plaque associated microglia hyper-secrete extracellular vesicles and accelerate tau propagation in a humanized APP mouse model. *Molecular Neurodegeneration*, *16*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00440-9>
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015).** Ectosomes and exosomes : Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, *25*(6), 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>
- Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2015).** Extracellular vesicles—Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *40*, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.007>

- Colin**, M., Dujardin, S., Schraen-Maschke, S., Meno-Tetang, G., Duyckaerts, C., Courade, J.-P., & Buée, L. (2020). From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathologica*, *139*(1), 3-25. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02087-9>
- Colombo**, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 24), 5553-5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- Concepcion**, G. P., David, M. P. C., & Padlan, E. A. (2005). Why don't humans get scrapie from eating sheep? A possible explanation based on secondary structure predictions. *Medical Hypotheses*, *64*(5), 919-924. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.11.021>
- Constantinidis**, J., Richard, J., & Tissot, R. (1974). Pick's disease. Histological and clinical correlations. *European Neurology*, *11*(4), 208-217. <https://doi.org/10.1159/000114320>
- Cooper**, J. M., Lathuiliere, A., Migliorini, M., Arai, A. L., Wani, M. M., Dujardin, S., Muratoglu, S. C., Hyman, B. T., & Strickland, D. K. (2021). Regulation of tau internalization, degradation, and seeding by LRP1 reveals multiple pathways for tau catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100715. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100715>
- Corder**, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, *261*(5123), 921-923. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>
- Cornblath**, E. J., Li, H. L., Changolkar, L., Zhang, B., Brown, H. J., Gathagan, R. J., Olufemi, M. F., Trojanowski, J. Q., Bassett, D. S., Lee, V. M. Y., & Henderson, M. X. (2021). Computational modeling of tau pathology spread reveals patterns of regional vulnerability and the impact of a genetic risk factor. *Science Advances*, *7*(24), eabg6677. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg6677>
- Couchie**, D., Mavilia, C., Georgieff, I. S., Liem, R. K., Shelanski, M. L., & Nunez, J. (1992). Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(10), 4378-4381. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4378>
- Cowan**, C. M., & Mudher, A. (2013). Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Frontiers in Neurology*, *4*, 114. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00114>
- Croft**, C. L., Wade, M. A., Kurbatskaya, K., Mastrandreas, P., Hughes, M. M., Phillips, E. C., Pooler, A. M., Perkinson, M. S., Hanger, D. P., & Noble, W. (2017). Membrane association and release of wild-type and pathological tau from organotypic brain slice cultures. *Cell Death & Disease*, *8*(3), e2671-e2671. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.97>
- Crowther**, R. A. (1991). Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(6), 2288-2292. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2288>

Crutch, S. J., Lehmann, M., Schott, J. M., Rabinovici, G. D., Rossor, M. N., & Fox, N. C. (2012). Posterior cortical atrophy. *The Lancet Neurology*, *11*(2), 170-178. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70289-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70289-7)

D

Dai, C., Hu, W., Tung, Y. C., Liu, F., Gong, C.-X., & Iqbal, K. (2018). Tau passive immunization blocks seeding and spread of Alzheimer hyperphosphorylated Tau-induced pathology in 3 × Tg-AD mice. *Alzheimer's Research & Therapy*, *10*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0341-7>

Dawson, H. N., Ferreira, A., Eyster, M. V., Ghoshal, N., Binder, L. I., & Vitek, M. P. (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 6), 1179-1187.

de Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D. H., Kopeikina, K. J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K. H., Carlson, G. A., Spire-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2012). Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron*, *73*(4), 685-697. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>

Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P., & López, J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, *106*(5), 1604-1611. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1095>

Delacourte, A., & Defossez, A. (1986). Alzheimer's disease : Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *Journal of the Neurological Sciences*, *76*(2-3), 173-186. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(86\)90167-x](https://doi.org/10.1016/0022-510x(86)90167-x)

Delacourte, A., Sergeant, N., Wattez, A., Gauvreau, D., & Robitaille, Y. (1998). Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Annals of Neurology*, *43*(2), 193-204. <https://doi.org/10.1002/ana.410430209>

Delaère, P., Duyckaerts, C., Masters, C., Beyreuther, K., Piette, F., & Hauw, J. J. (1990). Large amounts of neocortical beta A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person. *Neuroscience Letters*, *116*(1-2), 87-93. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90391-l](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90391-l)

Derouesné, C. (2014). Des observations originales d'Arnold Pick à la démence frontotemporale : Regard sur le présent à partir du passé Un aperçu historique. *Gériatrie et Psychologie Neuropsychiatrie du Vieillissement*, *12*(1), 74-84. <https://doi.org/10.1684/pnv.2014.0452>

Deun, J. V., Jo, A., Li, H., Lin, H.-Y., Weissleder, R., Im, H., & Lee, H. (2020). Integrated Dual-Mode Chromatography to Enrich Extracellular Vesicles from Plasma. *Advanced Biosystems*, *4*(12), 1900310. <https://doi.org/10.1002/adbi.201900310>

DeVos, S. L., Miller, R. L., Schoch, K. M., Holmes, B. B., Kebodeaux, C. S., Wegener, A. J., Chen, G., Shen, T., Tran, H., Nichols, B., Zanardi, T. A., Kordasiewicz, H. B., Swayze, E. E., Bennett, C. F., Diamond, M. I., & Miller, T. M. (2017). Tau reduction prevents neuronal loss and reverses

pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Science Translational Medicine*, 9(374), eaag0481. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag0481>

Díaz-Hernández, M., Gómez-Ramos, A., Rubio, A., Gómez-Villafuertes, R., Naranjo, J. R., Miras-Portugal, M. T., & Avila, J. (2010). Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase Promotes the Neurotoxicity Effect of Extracellular Tau. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32539-32548. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.145003>

Dickson, D. W. (1999). Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Journal of Neurology*, 246(2), II6-II15. <https://doi.org/10.1007/BF03161076>

Dickson, D. W., Ahmed, Z., Algom, A. A., Tsuboi, Y., & Josephs, K. A. (2010). Neuropathology of variants of progressive supranuclear palsy. *Current Opinion in Neurology*, 23(4), 394-400. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32833be924>

Ding, F., O'Donnell, J., Xu, Q., Kang, N., Goldman, N., & Nedergaard, M. (2016). Changes in the composition of brain interstitial ions control the sleep-wake cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 550-555. <https://doi.org/10.1126/science.aad4821>

Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., & Holzbaur, E. L. F. (2008). Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *Science*, 319(5866), 1086-1089. <https://doi.org/10.1126/science.1152993>

Doeuivre, L., Plawinski, L., Toti, F., & Anglés-Cano, E. (2009). Cell-derived microparticles : A new challenge in neuroscience. *Journal of Neurochemistry*, 110(2), 457-468. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06163.x>

Dotti, C. G., Banker, G. A., & Binder, L. I. (1987). The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience*, 23(1), 121-130. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90276-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90276-4)

Drepper, F., Biernat, J., Kaniyappan, S., Meyer, H. E., Mandelkow, E. M., Warscheid, B., & Mandelkow, E. (2020). A combinatorial native MS and LC-MS/MS approach reveals high intrinsic phosphorylation of human Tau but minimal levels of other key modifications. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(52), 18213-18225. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015882>

Drubin, D. G., Caput, D., & Kirschner, M. W. (1984). Studies on the expression of the microtubule-associated protein, tau, during mouse brain development, with newly isolated complementary DNA probes. *The Journal of Cell Biology*, 98(3), 1090-1097. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.3.1090>

Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Carrier, S., Lieger, S., Gonzalez, J. A., Deramecourt, V., Déglon, N., Maurage, C.-A., Frosch, M. P., Hyman, B. T., Colin, M., & Buée, L. (2018). Different tau species lead to heterogeneous tau pathology propagation and misfolding. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0637-7>

Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., Loyens, A., Galas, M.-C., Bousset, L., Melki, R., Aurégan, G., Hantraye, P., Brouillet, E., Buée, L., & Colin, M. (2014).

Ectosomes : A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein. *PLoS ONE*, 9(6), e100760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100760>

Dujardin, S., Colin, M., & Buée, L. (2015). Invited review : Animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic: Animal models of tauopathies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41(1), 59-80. <https://doi.org/10.1111/nan.12200>

Dujardin, S., Commins, C., Lathuiliere, A., Beerepoot, P., Fernandes, A. R., Kamath, T. V., De Los Santos, M. B., Klickstein, N., Corjuc, D. L., Corjuc, B. T., Dooley, P. M., Viode, A., Oakley, D. H., Moore, B. D., Mullin, K., Jean-Gilles, D., Clark, R., Atchison, K., Moore, R., ... Hyman, B. T. (2020). Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 26(8), 1256-1263. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0938-9>

Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Déglon, N., Colin, M., & Buée, L. (2014). Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: Relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), 14. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>

Duyckaerts, C. (2011). Tau pathology in children and young adults: Can you still be unconditionally baptist? *Acta Neuropathologica*, 121(2), 145-147. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0794-7>

Duyckaerts, C., & Hauw, J.-J. (1997). Prevalence, Incidence and Duration of Braak's Stages in the General Population: Can We Know? *Neurobiology of Aging*, 18(4), 362-369. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00047-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00047-X)

Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Ando, K., Seilhean, D., Privat, N., Yilmaz, Z., Peckeu, L., Amar, E., Comoy, E., Maceski, A., Lehmann, S., Brion, J.-P., Brandel, J.-P., & Haïk, S. (2018). Neuropathology of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease and immunoassay of French cadaver-sourced growth hormone batches suggest possible transmission of tauopathy and long incubation periods for the transmission of Aβ pathology. *Acta Neuropathologica*, 135(2), 201-212. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1791-x>

E

Edsbagge, M., Tisell, M., Jacobsson, L., & Wikkelso, C. (2004). Spinal CSF absorption in healthy individuals. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(6), R1450-1455. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00215.2004>

Eken, C., Sadallah, S., Martin, P. J., Treves, S., & Schifferli, J. A. (2013). Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology*, 218(3), 382-392. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.021>

EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles : Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), 347-357. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>

Engelenburg, S. B. V., Shtengel, G., Sengupta, P., Waki, K., Jarnik, M., Ablan, S. D., Freed, E. O., Hess, H. F., & Lippincott-Schwartz, J. (2014). Distribution of ESCRT Machinery at HIV Assembly Sites Reveals Virus Scaffolding of ESCRT Subunits. *Science*, *343*(6171), 653-656. <https://doi.org/10.1126/science.1247786>

F

Fagiani, F., Lanni, C., Racchi, M., & Govoni, S. (2020). Targeting dementias through cancer kinases inhibition. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, *6*(1), e12044. <https://doi.org/10.1002/trc2.12044>

Falcon, B., Cavallini, A., Angers, R., Glover, S., Murray, T. K., Barnham, L., Jackson, S., O'Neill, M. J., Isaacs, A. M., Hutton, M. L., Szekeres, P. G., Goedert, M., & Bose, S. (2015). Conformation Determines the Seeding Potencies of Native and Recombinant Tau Aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(2), 1049-1065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589309>

Falcon, B., Noad, J., McMahon, H., Randow, F., & Goedert, M. (2018). Galectin-8-mediated selective autophagy protects against seeded tau aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(7), 2438-2451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.809293>

Falcon, B., Zhang, W., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Vidal, R., Crowther, R. A., Ghetti, B., Scheres, S. H. W., & Goedert, M. (2018). Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. *Nature*, *561*(7721), 137-140. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0454-y>

Falcon, B., Zhang, W., Schweighauser, M., Murzin, A. G., Vidal, R., Garringer, H. J., Ghetti, B., Scheres, S. H. W., & Goedert, M. (2018). Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta Neuropathologica*, *136*(5), 699-708. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1914-z>

Falcon, B., Zivanov, J., Zhang, W., Murzin, A. G., Garringer, H. J., Vidal, R., Crowther, R. A., Newell, K. L., Ghetti, B., Goedert, M., & Scheres, S. H. W. (2019). Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature*, *568*(7752), 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1026-5>

Feany, M. B., Mattiace, L. A., & Dickson, D. W. (1996). Neuropathologic Overlap of Progressive Supranuclear Palsy, Pick's Disease and Corticobasal Degeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *55*(1), 53-67. <https://doi.org/10.1097/00005072-199601000-00006>

Ferreira, D., Nordberg, A., & Westman, E. (2020). Biological subtypes of Alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology*, *94*(10), 436-448. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009058>

Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., & Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(26), 9683-9688. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308413101>

- Fiandaca**, M. S., Kapogiannis, D., Mapstone, M., Boxer, A., Eitan, E., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Petersen, R. C., Federoff, H. J., Miller, B. L., & Goetzl, E. J. (2015). Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes : A case-control study. *Alzheimer's & Dementia*, *11*(6), 600-607.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.06.008>
- Fichou**, Y., Lin, Y., Rauch, J. N., Vigers, M., Zeng, Z., Srivastava, M., Keller, T. J., Freed, J. H., Kosik, K. S., & Han, S. (2018). Cofactors are essential constituents of stable and seeding-active tau fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(52), 13234-13239. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810058115>
- Fitzpatrick**, A. W. P., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Crowther, R. A., Ghetti, B., Goedert, M., & Scheres, S. H. W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*, *547*(7662), 185-190. <https://doi.org/10.1038/nature23002>
- Flavin**, W. P., Bousset, L., Green, Z. C., Chu, Y., Skarpathiotis, S., Chaney, M. J., Kordower, J. H., Melki, R., & Campbell, E. M. (2017). Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathologica*, *134*(4), 629-653. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1722-x>
- Foiani**, M. S., Woollacott, I. O., Heller, C., Bocchetta, M., Heslegrave, A., Dick, K. M., Russell, L. L., Marshall, C. R., Mead, S., Schott, J. M., Fox, N. C., Warren, J. D., Zetterberg, H., & Rohrer, J. D. (2018). Plasma tau is increased in frontotemporal dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *89*(8), 804-807. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317260>
- Fontaine**, S. N., Zheng, D., Sabbagh, J. J., Martin, M. D., Chaput, D., Darling, A., Trotter, J. H., Stothert, A. R., Nordhues, B. A., Lussier, A., Baker, J., Shelton, L., Kahn, M., Blair, L. J., Stevens, S. M., & Dickey, C. A. (2016). DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *The EMBO Journal*, *35*(14), 1537-1549. <https://doi.org/10.15252/embj.201593489>
- Forrest**, S. L., Kril, J. J., Stevens, C. H., Kwok, J. B., Hallupp, M., Kim, W. S., Huang, Y., McGinley, C. V., Werka, H., Kiernan, M. C., Götz, J., Spillantini, M. G., Hodges, J. R., Ittner, L. M., & Halliday, G. M. (2018). Retiring the term FTDP-17 as MAPT mutations are genetic forms of sporadic frontotemporal tauopathies. *Brain: A Journal of Neurology*, *141*(2), 521-534. <https://doi.org/10.1093/brain/awx328>
- Foster**, N. L., Wilhelmsen, K., Sima, A. A., Jones, M. Z., D'Amato, C. J., & Gilman, S. (1997). Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 : A consensus conference. Conference Participants. *Annals of Neurology*, *41*(6), 706-715. <https://doi.org/10.1002/ana.410410606>
- Franzmeier**, N., Neitzel, J., Rubinski, A., Smith, R., Strandberg, O., Ossenkoppele, R., Hansson, O., & Ewers, M. (2020). Functional brain architecture is associated with the rate of tau accumulation in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, *11*(1), 347. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14159-1>
- Friedhoff**, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., Davies, P., & Mandelkow, E. (1998). A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America, 95(26), 15712-15717.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15712>

Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J., & Feany, M. B. (2014). Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nature Neuroscience*, 17(3), 357-366.
<https://doi.org/10.1038/nn.3639>

Frost, B., Jacks, R. L., & Diamond, M. I. (2009). Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12845-12852.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>

Frost, B., Ollesch, J., Wille, H., & Diamond, M. I. (2009). Conformational Diversity of Wild-type Tau Fibrils Specified by Templated Conformation Change. *Journal of Biological Chemistry*, 284(6), 3546-3551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805627200>

Fu, H., Hardy, J., & Duff, K. E. (2018). Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1350-1358. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0221-2>

Fu, H., Possenti, A., Freer, R., Nakano, Y., Hernandez Villegas, N. C., Tang, M., Cauhy, P. V. M., Lassus, B. A., Chen, S., Fowler, S. L., Figueroa, H. Y., Huey, E. D., Johnson, G. V. W., Vendruscolo, M., & Duff, K. E. (2019). A tau homeostasis signature is linked with the cellular and regional vulnerability of excitatory neurons to tau pathology. *Nature Neuroscience*, 22(1), 47-56.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0298-7>

Fujita, Y., Hoshina, T., Matsuzaki, J., Yoshioka, Y., Kadota, T., Hosaka, Y., Fujimoto, S., Kawamoto, H., Watanabe, N., Sawaki, K., Sakamoto, Y., Miyajima, M., Lee, K., Nakaharai, K., Horino, T., Nakagawa, R., Araya, J., Miyato, M., Yoshida, M., ... Ochiya, T. (2021). Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(8), e12092.
<https://doi.org/10.1002/jev2.12092>

Furman, J. L., Holmes, B. B., & Diamond, M. I. (2015). Sensitive Detection of Proteopathic Seeding Activity with FRET Flow Cytometry. *Journal of Visualized Experiments*, 106, 53205.
<https://doi.org/10.3791/53205>

Furman, J. L., Vaquer-Alicea, J., White, C. L., Cairns, N. J., Nelson, P. T., & Diamond, M. I. (2017). Widespread tau seeding activity at early Braak stages. *Acta Neuropathologica*, 133(1), 91-100.
<https://doi.org/10.1007/s00401-016-1644-z>

Furukawa, Y., Kaneko, K., & Nukina, N. (2011). Tau Protein Assembles into Isoform- and Disulfide-dependent Polymorphic Fibrils with Distinct Structural Properties *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27236-27246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.248963>

G

Gajdusek, D. C. (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science (New York, N.Y.)*, 197(4307), 943-960. <https://doi.org/10.1126/science.142303>

Galvin, J. E. (2017). Prevention of Alzheimer's Disease : Lessons Learned and Applied. *Journal of the American Geriatrics Society*, 65(10), 2128-2133. <https://doi.org/10.1111/jgs.14997>

Gámez-Valero, A., Beyer, K., & Borràs, F. E. (2019). Extracellular vesicles, new actors in the search for biomarkers of dementias. *Neurobiology of Aging*, *74*, 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.10.006>

Georgieff, I. S., Liem, R. K., Mellado, W., Nunez, J., & Shelanski, M. L. (1991). High molecular weight tau : Preferential localization in the peripheral nervous system. *Journal of Cell Science*, *100 (Pt 1)*, 55-60.

Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussière, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G., & Hof, P. R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, *60(9)*, 1495-1500. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000063311.58879.01>

Giannini, L. A. A., Irwin, D. J., McMillan, C. T., Ash, S., Rascovsky, K., Wolk, D. A., Van Deerlin, V. M., Lee, E. B., Trojanowski, J. Q., & Grossman, M. (2017). Clinical marker for Alzheimer disease pathology in logopenic primary progressive aphasia. *Neurology*, *88(24)*, 2276-2284. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004034>

Giasson, B. I., Forman, M. S., Higuchi, M., Golbe, L. I., Graves, C. L., Kotzbauer, P. T., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2003). Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science (New York, N.Y.)*, *300(5619)*, 636- 640. <https://doi.org/10.1126/science.1082324>

Gibbons, G. S., Banks, R. A., Kim, B., Xu, H., Changolkar, L., Leight, S. N., Riddle, D. M., Li, C., Gathagan, R. J., Brown, H. J., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2017). GFP-Mutant Human Tau Transgenic Mice Develop Tauopathy Following CNS Injections of Alzheimer's Brain-Derived Pathological Tau or Synthetic Mutant Human Tau Fibrils. *The Journal of Neuroscience*, *37(47)*, 11485-11494. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2393-17.2017>

Gibbons, G. S., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2019). Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau. *JAMA neurology*, *76(1)*, 101-108. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2505>

Glennner, G. G., Wong, C. W., Quaranta, V., & Eanes, E. D. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease : Their nature and pathogenesis. *Applied Pathology*, *2(6)*, 357-369.

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., & James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, *349(6311)*, 704-706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>

Goedert, M. (2016). The ordered assembly of tau is the gain-of-toxic function that causes human tauopathies. *Alzheimer's & Dementia*, *12(10)*, 1040-1050. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.09.001>

Goedert, M., & Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein : Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *The EMBO Journal*, *9(13)*, 4225-4230. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07870.x>

Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R. A., Cohen, P., Vanmechelen, E., Vandermeeren, M., & Cras, P. (1994). Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's

disease : Identification of phosphorylation sites in tau protein. *The Biochemical Journal*, 301 (Pt 3), 871-877. <https://doi.org/10.1042/bj3010871>

Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J., & Crowther, R. A. (1996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*, 383(6600), 550-553. <https://doi.org/10.1038/383550a0>

Goedert, M., Spillantini, M. G., & Crowther, R. A. (1992). Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1983-1987. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1983>

Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: Sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4), 519-526. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9)

Goetzl, E. J., Abner, E. L., Jicha, G. A., Kapogiannis, D., & Schwartz, J. B. (2018). Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(2), 888-893. <https://doi.org/10.1096/fj.201700731R>

Goetzl, E. J., Boxer, A., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Petersen, R. C., Miller, B. L., & Kapogiannis, D. (2015). Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*, 85(1), 40-47. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001702>

Gomes, L. A., Hipp, S. A., Rijal Upadhaya, A., Balakrishnan, K., Ospitalieri, S., Koper, M. J., Largo-Barrientos, P., Uytterhoeven, V., Reichwald, J., Rabe, S., Vandenberghe, R., von Arnim, C. A. F., Tousseyn, T., Feederle, R., Giudici, C., Willem, M., Staufenbiel, M., & Thal, D. R. (2019). A β -induced acceleration of Alzheimer-related τ -pathology spreading and its association with prion protein. *Acta Neuropathologica*, 138(6), 913-941. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02053-5>

Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E., & Hyman, B. T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 41(1), 17-24. <https://doi.org/10.1002/ana.410410106>

Gould, S. J., & Raposo, G. (2013). As we wait : Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389>

Graff-Radford, J., Yong, K. X. X., Apostolova, L. G., Bouwman, F. H., Carrillo, M., Dickerson, B. C., Rabinovici, G. D., Schott, J. M., Jones, D. T., & Murray, M. E. (2021). New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers. *The Lancet Neurology*, 20(3), 222-234. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30440-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30440-3)

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913-4917. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>

Gu, Y., Oyama, F., & Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *Journal of Neurochemistry*, 67(3), 1235-1244. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67031235.x>

Guix, F., Corbett, G., Cha, D., Mustapic, M., Liu, W., Mengel, D., Chen, Z., Aikawa, E., Young-Pearse, T., Kapogiannis, D., Selkoe, D., & Walsh, D. (2018). Detection of Aggregation-Competent Tau in Neuron-Derived Extracellular Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 663. <https://doi.org/10.3390/ijms19030663>

Guo, J. L., & Lee, V. M.-Y. (2011). Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 15317-15331. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.209296>

Guo, J. L., Narasimhan, S., Changolkar, L., He, Z., Stieber, A., Zhang, B., Gathagan, R. J., Iba, M., McBride, J. D., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2016). Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(12), 2635-2654. <https://doi.org/10.1084/jem.20160833>

Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 133(5), 665-704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>

H

Habes, M., Grothe, M. J., Tunc, B., McMillan, C., Wolk, D. A., & Davatzikos, C. (2020). Disentangling Heterogeneity in Alzheimer's Disease and Related Dementias Using Data-Driven Methods. *Biological Psychiatry*, 88(1), 70-82. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.01.016>

Hadlow, W. J. (1959). SCRAPIE AND KURU. *The Lancet*, 274(7097), 289-290. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(59\)92081-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)92081-1)

Hagel, L., Östberg, M., & Andersson, T. (1996). Apparent pore size distributions of chromatography media. *Journal of Chromatography A*, 743(1), 33-42. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00130-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00130-6)

Hagiwara, K., Hara, H., & Hanada, K. (2013). Species-barrier phenomenon in prion transmissibility from a viewpoint of protein science. *The Journal of Biochemistry*, 153(2), 139-145. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs148>

Hall, G. F., & Saman, S. (2012). Death or secretion? The demise of a plausible assumption about CSF-tau in Alzheimer Disease? *Communicative & Integrative Biology*, 5(6), 623-626. <https://doi.org/10.4161/cib.21437>

Hampel, H., Blennow, K., Shaw, L. M., Hoessler, Y. C., Zetterberg, H., & Trojanowski, J. Q. (2010). Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 45(1), 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.10.010>

Han, H., Li, K., Yan, J., Zhu, K., & Fu, Y. (2012). An in vivo study with an MRI tracer method reveals the biophysical properties of interstitial fluid in the rat brain. *Science China Life Sciences*, 55(9), 782-787. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4361-4>

- Han, H., Shi, C., Fu, Y., Zuo, L., Lee, K., He, Q., & Han, H. (2014).** A novel MRI tracer-based method for measuring water diffusion in the extracellular space of the rat brain. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*, *18*(3), 978-983. <https://doi.org/10.1109/JBHI.2014.2308279>
- Hanger, D. P., Byers, H. L., Wray, S., Leung, K.-Y., Saxton, M. J., Seereeram, A., Reynolds, C. H., Ward, M. A., & Anderton, B. H. (2007).** Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(32), 23645-23654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703269200>
- Hanna Al-Shaikh, F. S., Duara, R., Crook, J. E., Lesser, E. R., Schaeffer, J., Hinkle, K. M., Ross, O. A., Ertekin-Taner, N., Pedraza, O., Dickson, D. W., Graff-Radford, N. R., & Murray, M. E. (2020).** Selective Vulnerability of the Nucleus Basalis of Meynert Among Neuropathologic Subtypes of Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, *77*(2), 225-233. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.3606>
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983).** Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, *97*(2), 329-339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992).** Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, *256*(5054), 184-185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hardy, J., & Allsop, D. (1991).** Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, *12*, 383-388. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-V)
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002).** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5580), 353-356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Hasegawa, M., Smith, M. J., & Goedert, M. (1998).** Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Letters*, *437*(3), 207-210. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01217-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01217-4)
- Hauw, J. J., Daniel, S. E., Dickson, D., Horoupian, D. S., Jellinger, K., Lantos, P. L., McKee, A., Tabaton, M., & Litvan, I. (1994).** Preliminary NINDS neuropathologic criteria for Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy). *Neurology*, *44*(11), 2015-2019. <https://doi.org/10.1212/wnl.44.11.2015>
- Hauw, J. J., Verny, M., Delaère, P., Cervera, P., He, Y., & Duyckaerts, C. (1990).** Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging. *Neuroscience Letters*, *119*(2), 182-186. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90829-x](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90829-x)
- He, Z., Guo, J. L., McBride, J. D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., Zhang, B., Gathagan, R. J., Yue, C., Dengler, C., Stieber, A., Nitla, M., Coulter, D. A., Abel, T., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2018).** Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nature Medicine*, *24*(1), 29-38. <https://doi.org/10.1038/nm.4443>

- Hitt**, B. D., Vaquer-Alicea, J., Manon, V. A., Beaver, J. D., Kashmer, O. M., Garcia, J. N., & Diamond, M. I. (2021). Ultrasensitive tau biosensor cells detect no seeding in Alzheimer's disease CSF. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01185-8>
- Hock**, C., Golombowski, S., Naser, W., & Müller-Spahn, F. (1995). Increased levels of tau protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease—Correlation with degree of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 37(3), 414-415. <https://doi.org/10.1002/ana.410370325>
- Hoening**, M. C., Bischof, G. N., Seemiller, J., Hammes, J., Kukolja, J., Onur, Ö. A., Jessen, F., Fliessbach, K., Neumaier, B., Fink, G. R., van Eimeren, T., & Drzezga, A. (2018). Networks of tau distribution in Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 141(2), 568-581. <https://doi.org/10.1093/brain/awx353>
- Hof**, P. R., Bouras, C., Perl, D. P., & Morrison, J. H. (1994). Quantitative neuropathologic analysis of Pick's disease cases: Cortical distribution of Pick bodies and coexistence with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 87(2), 115-124. <https://doi.org/10.1007/BF00296179>
- Hoffmann**, R., Lee, V. M., Leight, S., Varga, I., & Otvos, L. (1997). Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry*, 36(26), 8114-8124. <https://doi.org/10.1021/bi970380+>
- Höglinger**, G. U., Respondek, G., Stamelou, M., Kurz, C., Josephs, K. A., Lang, A. E., Mollenhauer, B., Müller, U., Nilsson, C., Whitwell, J. L., Arzberger, T., Englund, E., Gelpi, E., Giese, A., Irwin, D. J., Meissner, W. G., Pantelyat, A., Rajput, A., Swieten, J. C. van, ... Litvan, I. (2017). Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: The movement disorder society criteria. *Movement Disorders*, 32(6), 853-864. <https://doi.org/10.1002/mds.26987>
- Holmes**, B. B., DeVos, S. L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M. O., Brodsky, F. M., Marasa, J., Bagchi, D. P., Kotzbauer, P. T., Miller, T. M., Papy-Garcia, D., & Diamond, M. I. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), E3138-E3147. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110>
- Holmes**, B. B., Furman, J. L., Mahan, T. E., Yamasaki, T. R., Mirbaha, H., Eades, W. C., Belaygorod, L., Cairns, N. J., Holtzman, D. M., & Diamond, M. I. (2014). Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), E4376-E4385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411649111>
- Hong**, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B. I., Geschwind, D. H., Bird, T. D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J. C., Wilhelmsen, K. C., Schellenberg, G. D., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (1998). Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5395), 1914-1917. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1914>
- Hoover**, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Lanier, L. M., Yuan, L.-L., Ashe, K. H., & Liao, D. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, 68(6), 1067-1081. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>

Horie, K., Barthélemy, N. R., Sato, C., & Bateman, R. J. (2021). CSF tau microtubule binding region identifies tau tangle and clinical stages of Alzheimer's disease. *Brain*, *144*(2), 515-527. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa373>

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmer, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., ... Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, *527*(7578), 329-335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>

Hoshino, A., Kim, H. S., Bojmar, L., Gyan, K. E., Cioffi, M., Hernandez, J., Zambirinis, C. P., Rodrigues, G., Molina, H., Heissel, S., Mark, M. T., Steiner, L., Benito-Martin, A., Lucotti, S., Di Giannatale, A., Offer, K., Nakajima, M., Williams, C., Nogués, L., ... Lyden, D. (2020). Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell*, *182*(4), 1044-1061.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.009>

Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S.-I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M. A., Bakhti, M., Grønberg, M., Möbius, W., Rhee, J., Barr, F. A., & Simons, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of Cell Biology*, *189*(2), 223-232. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>

Hu, Y.-B., Dammer, E. B., Ren, R.-J., & Wang, G. (2015). The endosomal-lysosomal system : From acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Translational Neurodegeneration*, *4*. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0041-1>

Hurley, J. H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current Opinion in Cell Biology*, *20*(1), 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.12.002>

Hurley, J. H. (2015). ESCRTs are everywhere. *The EMBO Journal*, *34*(19), 2398-2407. <https://doi.org/10.15252/emboj.201592484>

Hurley, J. H., & Odorizzi, G. (2012). Get on the exosome bus with ALIX. *Nature Cell Biology*, *14*(7), 654-655. <https://doi.org/10.1038/ncb2530>

Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., ... Heutink, P. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, *393*(6686), 702-705. <https://doi.org/10.1038/31508>

Hyman, B. T., Hoesen, G. V., Damasio, A. R., & Barnes, C. L. (1984). Alzheimer's disease : Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*, *225*(4667), 1168-1170. <https://doi.org/10.1126/science.6474172>

I

Iaccarino, L., Tammewar, G., Ayakta, N., Baker, S. L., Bejanin, A., Boxer, A. L., Gorno-Tempini, M. L., Janabi, M., Kramer, J. H., Lazaris, A., Lockhart, S. N., Miller, B. L., Miller, Z. A., O'Neil, J. P., Ossenkoppele, R., Rosen, H. J., Schonhaut, D. R., Jagust, W. J., & Rabinovici, G. D. (2018). Local and

distant relationships between amyloid, tau and neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *NeuroImage. Clinical*, 17, 452-464. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.09.016>

Iba, M., Guo, J. L., McBride, J. D., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2013). Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-Like Tauopathy. *Journal of Neuroscience*, 33(3), 1024-1037. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013>

Iba, M., McBride, J. D., Guo, J. L., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2015). 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 neuropathologica*, 130(3), 349-362. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1458-4>

Iiff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., Benveniste, H., Vates, G. E., Deane, R., Goldman, S. A., Nagelhus, E. A., & Nedergaard, M. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Science Translational Medicine*, 4(147), 147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>

Ingram, E. M., & Spillantini, M. G. (2002). Tau gene mutations : Dissecting the pathogenesis of FTDP-17. *Trends in Molecular Medicine*, 8(12), 555-562. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(02\)02440-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(02)02440-1)

Irwin, D. J., Abrams, J. Y., Schonberger, L. B., Leschek, E. W., Mills, J. L., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2013). Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. *JAMA Neurology*, 70(4), 462-468. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.1933>

Irwin, D. J., Brettschneider, J., McMillan, C. T., Cooper, F., Olm, C., Arnold, S. E., Van Deerlin, V. M., Seeley, W. W., Miller, B. L., Lee, E. B., Lee, V. M.-Y., Grossman, M., & Trojanowski, J. Q. (2016). Deep clinical and neuropathological phenotyping of Pick disease : Deep Phenotype Pick Disease. *Annals of Neurology*, 79(2), 272-287. <https://doi.org/10.1002/ana.24559>

Ishiki, A., Okamura, N., Furukawa, K., Furumoto, S., Harada, R., Tomita, N., Hiraoka, K., Watanuki, S., Ishikawa, Y., Tago, T., Funaki, Y., Iwata, R., Tashiro, M., Yanai, K., Kudo, Y., & Arai, H. (2015). Longitudinal Assessment of Tau Pathology in Patients with Alzheimer's Disease Using [18F]THK-5117 Positron Emission Tomography. *PloS One*, 10(10), e0140311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140311>

Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., Eersel, J. van, Wölfing, H., Chieng, B. C., Christie, M. J., Napier, I. A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., & Götz, J. (2010). Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell*, 142(3), 387-397. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>

J

Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., ... Silverberg, N. (2018). NIA-AA Research

Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535-562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>

Jackson, S. J., Kerridge, C., Cooper, J., Cavallini, A., Falcon, B., Cella, C. V., Landi, A., Szekeres, P. G., Murray, T. K., Ahmed, Z., Goedert, M., Hutton, M., O'Neill, M. J., & Bose, S. (2016). Short Fibrils Constitute the Major Species of Seed-Competent Tau in the Brains of Mice Transgenic for Human P301S Tau. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(3), 762- 772. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3542-15.2016>

Janelidze, S., Mattsson, N., Palmqvist, S., Smith, R., Beach, T. G., Serrano, G. E., Chai, X., Proctor, N. K., Eichenlaub, U., Zetterberg, H., Blennow, K., Reiman, E. M., Stomrud, E., Dage, J. L., & Hansson, O. (2020). Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: Relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nature Medicine*, 26(3), 379-386. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0755-1>

Janelidze, S., Stomrud, E., Smith, R., Palmqvist, S., Mattsson, N., Airey, D. C., Proctor, N. K., Chai, X., Shcherbinin, S., Sims, J. R., Triana-Baltzer, G., Theunis, C., Slemmon, R., Mercken, M., Kolb, H., Dage, J. L., & Hansson, O. (2020). Cerebrospinal fluid p-tau217 performs better than p-tau181 as a biomarker of Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15436-0>

Jang, H., Boltz, D. A., Webster, R. G., & Smeyne, R. J. (2009). Viral parkinsonism. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1792(7), 714-721. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.08.001>

Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., Wagner, S. L., Younkin, S. G., & Borchelt, D. R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Human Molecular Genetics*, 13(2), 159-170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>

Jankowsky, J. L., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Borchelt, D. R. (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies. *Biomolecular Engineering*, 17(6), 157-165. [https://doi.org/10.1016/s1389-0344\(01\)00067-3](https://doi.org/10.1016/s1389-0344(01)00067-3)

Janning, D., Igaev, M., Sündermann, F., Brühmann, J., Beutel, O., Heinisch, J. J., Bakota, L., Piehler, J., Junge, W., & Brandt, R. (2014). Single-molecule tracking of tau reveals fast kiss-and-hop interaction with microtubules in living neurons. *Molecular Biology of the Cell*, 25(22), 3541-3551. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-06-1099>

Jansen, I. E., Savage, J. E., Watanabe, K., Bryois, J., Williams, D. M., Steinberg, S., Sealock, J., Karlsson, I. K., Hägg, S., Athanasiu, L., Voyle, N., Proitsi, P., Witoelar, A., Stringer, S., Aarsland, D., Almdahl, I. S., Andersen, F., Bergh, S., Bettella, F., ... Posthuma, D. (2019). Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nature Genetics*, 51(3), 404-413. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0311-9>

Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2008). Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 32066-32076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805300200>

- Jeganathan**, S., von Bergen, M., Brutlach, H., Steinhoff, H.-J., & Mandelkow, E. (2006). Global Hairpin Folding of Tau in Solution. *Biochemistry*, 45(7), 2283-2293. <https://doi.org/10.1021/bi0521543>
- Jessen**, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System : A Beginner's Guide. *Neurochemical Research*, 40(12), 2583-2599. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>
- Jia**, L., Qiu, Q., Zhang, H., Chu, L., Du, Y., Zhang, J., Zhou, C., Liang, F., Shi, S., Wang, S., Qin, W., Wang, Q., Li, F., Wang, Q., Li, Y., Shen, L., Wei, Y., & Jia, J. (2019). Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 15(8), 1071-1080. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.05.002>
- Jiang**, S., & Bhaskar, K. (2020). Degradation and Transmission of Tau by Autophagic-Endolysosomal Networks and Potential Therapeutic Targets for Tauopathy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 0. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.586731>
- Jicha**, G. A., Bowser, R., Kazam, I. G., & Davies, P. (1997). Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *Journal of Neuroscience Research*, 48(2), 128-132. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4547\(19970415\)48:2<128::aid-jnr5>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4547(19970415)48:2<128::aid-jnr5>3.0.co;2-e)
- Johanson**, C., Stopa, E., McMillan, P., Roth, D., Funk, J., & Krinke, G. (2011). The distributional nexus of choroid plexus to cerebrospinal fluid, ependyma and brain : Toxicologic/pathologic phenomena, periventricular destabilization, and lesion spread. *Toxicologic Pathology*, 39(1), 186-212. <https://doi.org/10.1177/0192623310394214>
- Johnson**, K. A., Schultz, A., Betensky, R. A., Becker, J. A., Sepulcre, J., Rentz, D., Mormino, E., Chhatwal, J., Amariglio, R., Papp, K., Marshall, G., Albers, M., Mauro, S., Pepin, L., Alverio, J., Judge, K., Philiossaint, M., Shoup, T., Yokell, D., ... Sperling, R. (2016). Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 79(1), 110-119. <https://doi.org/10.1002/ana.24546>
- Johnstone**, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412-9420.
- Josephs**, K. A. (2017). Current Understanding of Neurodegenerative Diseases Associated With the Protein Tau. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(8), 1291-1303. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.04.016>
- Jr**, J. E. M., Sankaranarayanan, S., Guss, V., Lanzetti, A. J., Berisha, F., Neely, R. J., Slemmon, J. R., Portelius, E., Zetterberg, H., Blennow, K., Soares, H., Ahlijanian, M., & Albright, C. F. (2013). Characterization of Novel CSF Tau and ptau Biomarkers for Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, 8(10), e76523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076523>
- Jucker**, M., & Walker, L. C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*, 501(7465), 45-51. <https://doi.org/10.1038/nature12481>

K

Kadavath, H., Jaremko, M., Jaremko, Ł., Biernat, J., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2015). Folding of the Tau Protein on Microtubules. *Angewandte Chemie International Edition*, *54*(35), 10347-10351. <https://doi.org/10.1002/anie.201501714>

Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Letters*, *399*(3), 344-349. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(96\)01386-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01386-5)

Kanmert, D., Cantlon, A., Muratore, C. R., Jin, M., O'Malley, T. T., Lee, G., Young-Pearse, T. L., Selkoe, D. J., & Walsh, D. M. (2015). C-Terminally Truncated Forms of Tau, But Not Full-Length Tau or Its C-Terminal Fragments, Are Released from Neurons Independently of Cell Death. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *35*(30), 10851-10865. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0387-15.2015>

Karageorgiou, E., & Miller, B. L. (2014). Frontotemporal Lobar Degeneration: A Clinical Approach. *Seminars in Neurology*, *34*(02), 189-201. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1381735>

Karch, C. M., Jeng, A. T., & Goate, A. M. (2012). Extracellular Tau Levels Are Influenced by Variability in Tau That Is Associated with Tauopathies. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(51), 42751-42762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380642>

Karikari, T. K., Pascoal, T. A., Ashton, N. J., Janelidze, S., Benedet, A. L., Rodriguez, J. L., Chamoun, M., Savard, M., Kang, M. S., Therriault, J., Schöll, M., Massarweh, G., Soucy, J.-P., Höglund, K., Brinkmalm, G., Mattsson, N., Palmqvist, S., Gauthier, S., Stomrud, E., ... Blennow, K. (2020). Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: A diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *The Lancet. Neurology*, *19*(5), 422-433. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30071-5)

Karran, E., Mercken, M., & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *10*(9), 698-712. <https://doi.org/10.1038/nrd3505>

Katsinelos, T., Zeitler, M., Dimou, E., Karakatsani, A., Müller, H.-M., Nachman, E., Steringer, J. P., Ruiz de Almodovar, C., Nickel, W., & Jahn, T. R. (2018). Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Reports*, *23*(7), 2039-2055. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>

Kaufman, S. K., Sanders, D. W., Thomas, T. L., Ruchinkas, A. J., Vaquer-Alicea, J., Sharma, A. M., Miller, T. M., & Diamond, M. I. (2016). Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability In Vivo. *Neuron*, *92*(4), 796-812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.055>

Kaufman, S. K., Thomas, T. L., Del Tredici, K., Braak, H., & Diamond, M. I. (2017). Characterization of tau prion seeding activity and strains from formaldehyde-fixed tissue. *Acta Neuropathologica Communications*, *5*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0442-8>

- Kellogg**, E. H., Hejab, N. M. A., Poepsel, S., Downing, K. H., DiMaio, F., & Nogales, E. (2018). Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science*, 360(6394), 1242-1246. <https://doi.org/10.1126/science.aat1780>
- Kfoury**, N., Holmes, B. B., Jiang, H., Holtzman, D. M., & Diamond, M. I. (2012). Trans-cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19440-19451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346072>
- Kidd**, M. (1963). Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature*, 197(4863), 192-193. <https://doi.org/10.1038/197192b0>
- Kim**, D., Lim, S., Haque, M. M., Ryoo, N., Hong, H. S., Rhim, H., Lee, D.-E., Chang, Y.-T., Lee, J.-S., Cheong, E., Kim, D. J., & Kim, Y. K. (2015). Identification of disulfide cross-linked tau dimer responsible for tau propagation. *Scientific Reports*, 5, 15231. <https://doi.org/10.1038/srep15231>
- Kim**, W., Lee, S., Jung, C., Ahmed, A., Lee, G., & Hall, G. F. (2010). Interneuronal transfer of human tau between Lamprey central neurons in situ. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 19(2), 647-664. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1273>
- Kimura**, T., Whitcomb, D. J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., Sotiropoulos, I., Kim, E., Collingridge, G. L., Takashima, A., & Cho, K. (2014). Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1633), 20130144. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0144>
- Klein**, C., Kramer, E.-M., Cardine, A.-M., Schraven, B., Brandt, R., & Trotter, J. (2002). Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(3), 698-707.
- Knopman**, D. S., Jones, D. T., & Greicius, M. D. (2021). Failure to demonstrate efficacy of aducanumab : An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 17(4), 696-701. <https://doi.org/10.1002/alz.12213>
- Koedam**, E. L. G. E., Lauffer, V., van der Vlies, A. E., van der Flier, W. M., Scheltens, P., & Pijnenburg, Y. A. L. (2010). Early-versus late-onset Alzheimer's disease : More than age alone. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 19(4), 1401-1408. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1337>
- Köpke**, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Alonso, A. C., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 24374-24384.
- Kosik**, K. S., Orecchio, L. D., Bakalis, S., & Neve, R. L. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*, 2(4), 1389-1397. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90077-9)
- Kovacs**, G. G. (2018). Tauopathies. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 145, p. 355-368). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0>

Kovacs, G. G., Alafuzoff, I., Al-Sarraj, S., Arzberger, T., Bogdanovic, N., Capellari, S., Ferrer, I., Gelpi, E., Kövari, V., Kretschmar, H., Nagy, Z., Parchi, P., Seilhean, D., Soininen, H., Troakes, C., & Budka, H. (2008). Mixed brain pathologies in dementia : The BrainNet Europe consortium experience. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 26(4), 343-350. <https://doi.org/10.1159/000161560>

Kovacs, G. G., Lukic, M. J., Irwin, D. J., Arzberger, T., Respondek, G., Lee, E. B., Coughlin, D., Giese, A., Grossman, M., Kurz, C., McMillan, C. T., Gelpi, E., Compta, Y., van Swieten, J. C., Laat, L. D., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Robinson, J. L., Roeber, S., ... Höglinger, G. U. (2020). Distribution patterns of tau pathology in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathologica*, 140(2), 99-119. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02158-2>

Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), E968-E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>

L

Lam, S., Boluda, S., Hérard, A.-S., Petit, F., Eddarkaoui, S., Cambon, K., Network, T. B. N.-C. N., Picq, J.-L., Buée, L., Duyckaerts, C., Haïk, S., & Dhenain, M. (2021). Alzheimer's brain inoculation in A β -plaque bearing mice : Synaptic loss is linked to tau seeding and low microglial activity. *BioRxiv*, 2021.04.06.438654. <https://doi.org/10.1101/2021.04.06.438654>

Lannuzel, A., Michel, P. P., Caparros-Lefebvre, D., Abaul, J., Hocquemiller, R., & Ruberg, M. (2002). Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: Potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 17(1), 84-90. <https://doi.org/10.1002/mds.1246>

Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Clos, A. L., Jackson, G. R., & Kaye, R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-39>

Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M. J., Kiritoshi, T., Neugebauer, V., Jackson, G. R., & Kaye, R. (2012). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Scientific Reports*, 2, 700. <https://doi.org/10.1038/srep00700>

Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Sarmiento, J., Troncoso, J., Jackson, G. R., & Kaye, R. (2012). Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(5), 1946-1959. <https://doi.org/10.1096/fj.11-199851>

Lee, M. C. S., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L., & Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 87-123. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.105307>

- Lee, M. J., Lee, J. H., & Rubinsztein, D. C. (2013).** Tau degradation : The ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Progress in Neurobiology*, *105*, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.03.001>
- Lee, S., Kim, W., Li, Z., & Hall, G. F. (2012).** Accumulation of Vesicle-Associated Human Tau in Distal Dendrites Drives Degeneration and Tau Secretion in an *In Situ* Cellular Tauopathy Model. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2012*, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2012/172837>
- Lee, V. M.-Y., Brunden, K. R., Hutton, M., & Trojanowski, J. Q. (2011).** Developing Therapeutic Approaches to Tau, Selected Kinases, and Related Neuronal Protein Targets. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006437>
- Lehmann, L., Lo, A., Knox, K. M., & Barker-Haliski, M. (2021).** Alzheimer's Disease and Epilepsy : A Perspective on the Opportunities for Overlapping Therapeutic Innovation. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03332-y>
- Lei, Y., Han, H., Yuan, F., Javeed, A., & Zhao, Y. (2017).** The brain interstitial system : Anatomy, modeling, in vivo measurement, and applications. *Progress in Neurobiology*, *157*, 230-246. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.007>
- Leng, F., & Edison, P. (2021).** Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease : Where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, *17*(3), 157-172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Leroy, K., Bretteville, A., Schindowski, K., Gilissen, E., Authelet, M., De Decker, R., Yilmaz, Z., Buée, L., & Brion, J.-P. (2007).** Early Axonopathy Preceding Neurofibrillary Tangles in Mutant Tau Transgenic Mice. *The American Journal of Pathology*, *171*(3), 976-992. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070345>
- Leroy, M., Vaudran, L., Deramecourt, V., Pasquier, F., Chen, Y., Schraen, S., & Lebouvier, T. (2021).** Biomarqueurs du liquide cébrospinal. *Pratique Neurologique - FMC*, *12*(2), 165-179. <https://doi.org/10.1016/j.praneu.2021.03.014>
- Levarska, L., Zilka, N., Jadhav, S., Neradil, P., & Novak, M. (2013).** Of Rodents and Men : The Mysterious Interneuronal Pilgrimage of Misfolded Protein Tau in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *37*(3), 569-577. <https://doi.org/10.3233/JAD-131106>
- Levin, F., Ferreira, D., Lange, C., Dyrba, M., Westman, E., Buchert, R., Teipel, S. J., & Grothe, M. J. (2020).** FDG-PET subtypes of Alzheimer's disease and their association with distinct biomarker profiles and clinical trajectories. *Alzheimer's & Dementia*, *16*(S5), e042101. <https://doi.org/10.1002/alz.042101>
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W. L., Yen, S. H., Dickson, D. W., Davies, P., & Hutton, M. (2000).** Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature Genetics*, *25*(4), 402-405. <https://doi.org/10.1038/78078>

- Li, B., Antonyak, M. A., Zhang, J., & Cerione, R. A. (2012).** RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene*, *31*(45), 4740-4749. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.636>
- Liberski, P. P. (2014).** Prion, prionoids and infectious amyloid. *Parkinsonism & Related Disorders*, *20 Suppl 1*, S80-84. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70021-X](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70021-X)
- Lista, S., O'Bryant, S. E., Blennow, K., Dubois, B., Hugon, J., Zetterberg, H., & Hampel, H. (2015).** Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *47*(2), 291-317. <https://doi.org/10.3233/JAD-143006>
- Litvan, I., Agid, Y., Calne, D., Campbell, G., Dubois, B., Duvoisin, R. C., Goetz, C. G., Golbe, L. I., Grafman, J., Growdon, J. H., Hallett, M., Jankovic, J., Quinn, N. P., Tolosa, E., & Zee, D. S. (1996).** Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) : Report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology*, *47*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1212/wnl.47.1.1>
- Liu, L., Drouet, V., Wu, J. W., Witter, M. P., Small, S. A., Clelland, C., & Duff, K. (2012).** Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology In Vivo. *PLoS ONE*, *7*(2), e31302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>
- Llorens-Martin, M., Teixeira, C. M., Fuster-Matanzo, A., Jurado-Arjona, J., Borrell, V., Soriano, E., Avila, J., & Hernández, F. (2012).** Tau Isoform with Three Microtubule Binding Domains is a Marker of New Axons Generated from the Subgranular Zone in the Hippocampal Dentate Gyrus : Implications for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *29*(4), 921-930. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-112057>
- Lo Cicero, A., Stahl, P. D., & Raposo, G. (2015).** Extracellular vesicles shuffling intercellular messages : For good or for bad. *Current Opinion in Cell Biology*, *35*, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.013>
- Longobardi, A., Benussi, L., Nicsanu, R., Bellini, S., Ferrari, C., Saraceno, C., Zanardini, R., Catania, M., Di Fede, G., Squitti, R., Binetti, G., & Ghidoni, R. (2021).** Plasma Extracellular Vesicle Size and Concentration Are Altered in Alzheimer's Disease, Dementia With Lewy Bodies, and Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 667369. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.667369>
- Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., & Binder, L. I. (1990).** Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(21), 8422-8426. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8422>
- Lösche, W., Scholz, T., Temmler, U., Oberle, V., & Claus, R. A. (2004).** Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets*, *15*(2), 109-115. <https://doi.org/10.1080/09537100310001649885>

M

Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, S., Ikai, A., & Takashima, A. (2006). Increased levels of granular tau oligomers: An early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience Research*, *54*(3), 197-201. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.11.009>

Magnoni, S., Esparza, T. J., Conte, V., Carbonara, M., Carrabba, G., Holtzman, D. M., Zipfel, G. J., Stocchetti, N., & Brody, D. L. (2012). Tau elevations in the brain extracellular space correlate with reduced amyloid- β levels and predict adverse clinical outcomes after severe traumatic brain injury. *Brain: A Journal of Neurology*, *135*(Pt 4), 1268-1280. <https://doi.org/10.1093/brain/awr286>

Mailliot, C., Sergeant, N., Bussière, T., Caillet-Boudin, M. L., Delacourte, A., & Bu e, L. (1998). Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Letters*, *433*(3), 201-204. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00910-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00910-7)

Mair, W., Muntel, J., Tepper, K., Tang, S., Biernat, J., Seeley, W. W., Kosik, K. S., Mandelkow, E., Steen, H., & Steen, J. A. (2016). FLEXITau: Quantifying Post-translational Modifications of Tau Protein in Vitro and in Human Disease. *Analytical Chemistry*, *88*(7), 3704-3714. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04509>

Malia, T. J., Teplyakov, A., Ernst, R., Wu, S., Lacy, E. R., Liu, X., Vandermeeren, M., Mercken, M., Luo, J., Sweet, R. W., & Gilliland, G. L. (2016). Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated tau by the anti-tau antibody AT8. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *84*(4), 427-434. <https://doi.org/10.1002/prot.24988>

Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(7), a006247-a006247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006247>

Mandell, J. W., & Banker, G. A. (1995). The microtubule cytoskeleton and the development of neuronal polarity. *Neurobiology of Aging*, *16*(3), 229-237. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(94\)00164-V](https://doi.org/10.1016/0197-4580(94)00164-V)

Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleux, A., Dumont, J., Issad, T., Gerhardt, E., Pagesy, P., Vileno, M., Bournonville, C., Hamdane, M., Bantubungi, K., Lancel, S., Demeyer, D., Eddarkaoui, S., Vallez, E., Vieau, D., Humez, S., ... Blum, D. (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(8), 2257-2269. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>

Martini-Stoica, H., Cole, A. L., Swartzlander, D. B., Chen, F., Wan, Y.-W., Bajaj, L., Bader, D. A., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Liu, Z., Sardiello, M., & Zheng, H. (2018). TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(9), 2355-2377. <https://doi.org/10.1084/jem.20172158>

Matamoros, A. J., & Baas, P. W. (2016). Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system. *Brain Research Bulletin*, *126*, 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.016>

- Maté de Gérando**, A., d'Orange, M., Augustin, E., Joséphine, C., Aurégan, G., Gaudin-Guérif, M., Guillermier, M., Hérard, A.-S., Stimmer, L., Petit, F., Gipchtein, P., Jan, C., Escartin, C., Selingue, E., Carvalho, K., Blum, D., Brouillet, E., Hantraye, P., Gaillard, M.-C., ... Cambon, K. (2021). Neuronal tau species transfer to astrocytes and induce their loss according to tau aggregation state. *Brain*, *144*(4), 1167-1182. <https://doi.org/10.1093/brain/awab011>
- Mathieu**, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, *21*(1), 9-17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Matsuda**, H., Shigemoto, Y., & Sato, N. (2019). Neuroimaging of Alzheimer's disease : Focus on amyloid and tau PET. *Japanese Journal of Radiology*, *37*(11), 735-749. <https://doi.org/10.1007/s11604-019-00867-7>
- Mattsson**, N., Zetterberg, H., Janelidze, S., Insel, P. S., Andreasson, U., Stomrud, E., Palmqvist, S., Baker, D., Tan Hehir, C. A., Jeromin, A., Hanlon, D., Song, L., Shaw, L. M., Trojanowski, J. Q., Weiner, M. W., Hansson, O., Blennow, K., & ADNI Investigators. (2016). Plasma tau in Alzheimer disease. *Neurology*, *87*(17), 1827-1835. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003246>
- Mattsson-Carlgren**, N., Janelidze, S., Palmqvist, S., Cullen, N., Svenningsson, A. L., Strandberg, O., Mengel, D., Walsh, D. M., Stomrud, E., Dage, J. L., & Hansson, O. (2020). Longitudinal plasma p-tau₂₁₇ is increased in early stages of Alzheimer's disease. *Brain*, *143*(11), 3234-3241. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa286>
- Maurer**, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, *349*(9064), 1546-1549. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)10203-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)10203-8)
- McKhann**, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease : Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *7*(3), 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- McMillan**, P., Korvatska, E., Poorkaj, P., Evstafjeva, Z., Robinson, L., Greenup, L., Leverenz, J., Schellenberg, G. D., & D'Souza, I. (2008). Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, *511*(6), 788-803. <https://doi.org/10.1002/cne.21867>
- Medina**, M., & Avila, J. (2014). The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00113>
- Mendez**, M. F. (2017). Early-Onset Alzheimer Disease. *Neurologic Clinics*, *35*(2), 263-281. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.01.005>
- Meraz-Ríos**, M. A., León, K. I. L.-D., Campos-Peña, V., Anda-Hernández, M. A. D., & Mena-López, R. (2010). Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *112*(6), 1353-1367. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06511.x>

- Mercken, M., Vandermeeren, M., Lübke, U., Six, J., Boons, J., Vanmechelen, E., Van de Voorde, A., & Gheuens, J. (1992).** Affinity purification of human tau proteins and the construction of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human tau detection. *Journal of Neurochemistry*, *58*(2), 548-553. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09754.x>
- Merezhko, M., Uronen, R.-L., & Huttunen, H. J. (2020).** The Cell Biology of Tau Secretion. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.569818>
- Mesulam, M., Wicklund, A., Johnson, N., Rogalski, E., Léger, G. C., Rademaker, A., Weintraub, S., & Bigio, E. H. (2008).** Alzheimer and frontotemporal pathology in subsets of primary progressive aphasia. *Annals of Neurology*, *63*(6), 709-719. <https://doi.org/10.1002/ana.21388>
- Michel, C. H., Kumar, S., Pinotsi, D., Tunnacliffe, A., George-Hyslop, P. S., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., Kaminski, C. F., & Schierle, G. S. K. (2014).** Extracellular Monomeric Tau Protein Is Sufficient to Initiate the Spread of Tau Protein Pathology *. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(2), 956-967. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515445>
- Mielke, M. M., Hagen, C. E., Xu, J., Chai, X., Vemuri, P., Lowe, V. J., Airey, D. C., Knopman, D. S., Roberts, R. O., Machulda, M. M., Jack, C. R., Petersen, R. C., & Dage, J. L. (2018).** Plasma phospho-tau181 increases with Alzheimer's disease clinical severity and is associated with tau- and amyloid-positron emission tomography. *Alzheimer's & Dementia*, *14*(8), 989-997. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.013>
- Mirbaha, H., Chen, D., Morazova, O. A., Ruff, K. M., Sharma, A. M., Liu, X., Goodarzi, M., Pappu, R. V., Colby, D. W., Mirzaei, H., Joachimiak, L. A., & Diamond, M. I. (2018).** Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation. *ELife*, *7*, e36584. <https://doi.org/10.7554/eLife.36584>
- Mirbaha, H., Holmes, B. B., Sanders, D. W., Bieschke, J., & Diamond, M. I. (2015).** Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(24), 14893-14903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652693>
- Mohamed, N.-V., Desjardins, A., & Leclerc, N. (2017).** Tau secretion is correlated to an increase of Golgi dynamics. *PLOS ONE*, *12*(5), e0178288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178288>
- Mohamed, N.-V., Plouffe, V., Rémillard-Labrosse, G., Planel, E., & Leclerc, N. (2015).** Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons. *Scientific Reports*, *4*(1), 5715. <https://doi.org/10.1038/srep05715>
- Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., & Boehm, J. (2012).** Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N-Methyl-d-aspartate Receptor-dependent Tau Phosphorylation *. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(38), 32040-32053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>
- Montagne, A., Nation, D. A., Pa, J., Sweeney, M. D., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2016).** Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *131*(5), 687-707. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1570-0>

- Monteiro-Reis, S.,** Carvalho-Maia, C., Bart, G., Vainio, S. J., Pedro, J., Silva, E. R., Sales, G., Henrique, R., & Jerónimo, C. (2021). Secreted Extracellular Vesicle Molecular Cargo as a Novel Liquid Biopsy Diagnostics of Central Nervous System Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3267. <https://doi.org/10.3390/ijms22063267>
- Morelli, A. E.,** Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L. G., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., & Thomson, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), 3257-3266. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>
- Morris, M.,** Knudsen, G. M., Maeda, S., Trinidad, J. C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A. L., & Mucke, L. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neuroscience*, 18(8), 1183-1189. <https://doi.org/10.1038/nn.4067>
- Morsch, R.,** Simon, W., & Coleman, P. D. (1999). Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(2), 188-197. <https://doi.org/10.1097/00005072-199902000-00008>
- Moscoso, A.,** Grothe, M. J., Ashton, N. J., Karikari, T. K., Rodriguez, J. L., Snellman, A., Suárez-Calvet, M., Zetterberg, H., Blennow, K., Schöll, M., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2021). Time course of phosphorylated-tau181 in blood across the Alzheimer's disease spectrum. *Brain: A Journal of Neurology*, 144(1), 325-339. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa399>
- Mrdjen, D.,** Fox, E. J., Bukhari, S. A., Montine, K. S., Bendall, S. C., & Montine, T. J. (2019). The basis of cellular and regional vulnerability in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 138(5), 729-749. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02054-4>
- Mudher, A.,** Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Alavi Naini, S. M., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Buée, L., Goedert, M., & Brion, J.-P. (2017). What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0488-7>
- Mukrasch, M. D.,** Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2009). Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution. *PLOS Biology*, 7(2), e1000034. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>
- Mulcahy, L. A.,** Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- Müller, U.,** Winter, P., & Graeber, M. B. (2013). A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, 12(2), 129-130. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70307-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70307-1)
- Mullins, R. J.,** Mustapic, M., Goetzl, E. J., & Kapogiannis, D. (2017). Exosomal biomarkers of brain insulin resistance associated with regional atrophy in Alzheimer's disease. *Human Brain Mapping*, 38(4), 1933-1940. <https://doi.org/10.1002/hbm.23494>

Munoz-Garcia, D., & Ludwin, S. K. (1984). Classic and generalized variants of Pick's disease : A clinicopathological, ultrastructural, and immunocytochemical comparative study. *Annals of Neurology*, *16*(4), 467-480. <https://doi.org/10.1002/ana.410160408>

Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*, *19*(22), 1875-1885. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>

Muraoka, S., DeLeo, A. M., Sethi, M. K., Yukawa-Takamatsu, K., Yang, Z., Ko, J., Hogan, J. D., Ruan, Z., You, Y., Wang, Y., Medalla, M., Ikezu, S., Chen, M., Xia, W., Gorantla, S., Gendelman, H. E., Issadore, D., Zaia, J., & Ikezu, T. (2020). Proteomic and biological profiling of extracellular vesicles from Alzheimer's disease human brain tissues. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *16*(6), 896-907. <https://doi.org/10.1002/alz.12089>

Murayama, S., Mori, H., Ihara, Y., Bouldin, T. W., Suzuki, K., & Tomonaga, M. (1990). Immunocytochemical and ultrastructural studies of lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *27*(2), 137-148. <https://doi.org/10.1002/ana.410270208>

Murray, M. E., Graff-Radford, N. R., Ross, O. A., Petersen, R. C., Duara, R., & Dickson, D. W. (2011). Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: A retrospective study. *The Lancet Neurology*, *10*(9), 785-796. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70156-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70156-9)

Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., & Benson, M. D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, *254*(5028), 97-99. <https://doi.org/10.1126/science.1925564>

N

Nabhan, J. F., Hu, R., Oh, R. S., Cohen, S. N., & Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(11), 4146-4151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200448109>

Narasimhan, S., Guo, J. L., Changolkar, L., Stieber, A., McBride, J. D., Silva, L. V., He, Z., Zhang, B., Gathagan, R. J., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2017). Pathological Tau Strains from Human Brains Recapitulate the Diversity of Tauopathies in Nontransgenic Mouse Brain. *The Journal of Neuroscience*, *37*(47), 11406-11423. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1230-17.2017>

Naruse, S., Igarashi, S., Kobayashi, H., Aoki, K., Inuzuka, T., Kaneko, K., Shimizu, T., Iihara, K., Kojima, T., & Miyatake, T. (1991). Mis-sense mutation Val—Ile in exon 17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, *337*(8747), 978-979. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91612-x](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91612-x)

Neary, D., Snowden, J. S., Gustafson, L., Passant, U., Stuss, D., Black, S., Freedman, M., Kertesz, A., Robert, P. H., Albert, M., Boone, K., Miller, B. L., Cummings, J., & Benson, D. F. (1998). Frontotemporal lobar degeneration: A consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology*, *51*(6), 1546-1554. <https://doi.org/10.1212/wnl.51.6.1546>

- Neff**, R. A., Wang, M., Vatansever, S., Guo, L., Ming, C., Wang, Q., Wang, E., Horgusluoglu-Moloch, E., Song, W., Li, A., Castranio, E. L., Tcw, J., Ho, L., Goate, A., Fossati, V., Noggle, S., Gandy, S., Ehrlich, M. E., Katsel, P., ... Zhang, B. (2021). Molecular subtyping of Alzheimer's disease using RNA sequencing data reveals novel mechanisms and targets. *Science Advances*, 7(2), eabb5398. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb5398>
- Neve**, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M., & Donlon, T. A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Research*, 387(3), 271-280. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(86\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0169-328x(86)90033-1)
- Ngandu**, T., Lehtisalo, J., Solomon, A., Levälähti, E., Ahtiluoto, S., Antikainen, R., Bäckman, L., Hänninen, T., Jula, A., Laatikainen, T., Lindström, J., Mangialasche, F., Pajanen, T., Pajala, S., Peltonen, M., Rauramaa, R., Stigsdotter-Neely, A., Strandberg, T., Tuomilehto, J., ... Kivipelto, M. (2015). A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): A randomised controlled trial. *The Lancet*, 385(9984), 2255-2263. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60461-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60461-5)
- Nicholls**, S. B., DeVos, S. L., Commins, C., Nobuhara, C., Bennett, R. E., Corjuc, D. L., Maury, E., Eftekharzadeh, B., Akingbade, O., Fan, Z., Roe, A. D., Takeda, S., Wegmann, S., & Hyman, B. T. (2017). Characterization of TauC3 antibody and demonstration of its potential to block tau propagation. *PLOS ONE*, 12(5), e0177914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177914>
- Nickel**, W., & Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 148-155. <https://doi.org/10.1038/nrm2617>
- Nobuhara**, C. K., DeVos, S. L., Commins, C., Wegmann, S., Moore, B. D., Roe, A. D., Costantino, I., Frosch, M. P., Pitstick, R., Carlson, G. A., Hock, C., Nitsch, R. M., Montrasio, F., Grimm, J., Cheung, A. E., Dunah, A. W., Wittmann, M., Bussiere, T., Weinreb, P. H., ... Takeda, S. (2017). Tau Antibody Targeting Pathological Species Blocks Neuronal Uptake and Interneuron Propagation of Tau in Vitro. *The American Journal of Pathology*, 187(6), 1399-1412. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.01.022>
- Nonaka**, T., Watanabe, S. T., Iwatsubo, T., & Hasegawa, M. (2010). Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: Cellular models of neurodegenerative diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 34885-34898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.148460>
- Norman**, M., Ter-Ovanesyan, D., Trieu, W., Lazarovits, R., Kowal, E. J. K., Lee, J. H., Chen-Plotkin, A. S., Regev, A., Church, G. M., & Walt, D. R. (2021). L1CAM is not associated with extracellular vesicles in human cerebrospinal fluid or plasma. *Nature Methods*, 18(6), 631-634. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01174-8>
- Norton**, S., Matthews, F. E., Barnes, D. E., Yaffe, K., & Brayne, C. (2014). Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. *The Lancet. Neurology*, 13(8), 788-794. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70136-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70136-X)

O

Orr, M. E., Sullivan, A. C., & Frost, B. (2017). A Brief Overview of Tauopathy: Causes, Consequences, and Therapeutic Strategies. *Trends in pharmacological sciences*, *38*(7), 637-648. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.03.011>

Ossenkoppele, R., Iaccarino, L., Schonhaut, D. R., Brown, J. A., La Joie, R., O'Neil, J. P., Janabi, M., Baker, S. L., Kramer, J. H., Gorno-Tempini, M.-L., Miller, B. L., Rosen, H. J., Seeley, W. W., Jagust, W. J., & Rabinovici, G. D. (2019). Tau covariance patterns in Alzheimer's disease patients match intrinsic connectivity networks in the healthy brain. *NeuroImage: Clinical*, *23*, 101848. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.101848>

Ossenkoppele, R., Lyoo, C. H., Sudre, C. H., van Westen, D., Cho, H., Ryu, Y. H., Choi, J. Y., Smith, R., Strandberg, O., Palmqvist, S., Westman, E., Tsai, R., Kramer, J., Boxer, A. L., Gorno-Tempini, M. L., La Joie, R., Miller, B. L., Rabinovici, G. D., & Hansson, O. (2020). Distinct tau PET patterns in atrophy-defined subtypes of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *16*(2), 335-344. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.08.201>

Ossenkoppele, R., Pijnenburg, Y. A. L., Perry, D. C., Cohn-Sheehy, B. I., Scheltens, N. M. E., Vogel, J. W., Kramer, J. H., van der Vlies, A. E., La Joie, R., Rosen, H. J., van der Flier, W. M., Grinberg, L. T., Rozemuller, A. J., Huang, E. J., van Berckel, B. N. M., Miller, B. L., Barkhof, F., Jagust, W. J., Scheltens, P., ... Rabinovici, G. D. (2015). The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease: Clinical, neuroimaging and pathological features. *Brain: A Journal of Neurology*, *138*(Pt 9), 2732-2749. <https://doi.org/10.1093/brain/awv191>

Ossenkoppele, R., Schonhaut, D. R., Schöll, M., Lockhart, S. N., Ayakta, N., Baker, S. L., O'Neil, J. P., Janabi, M., Lazaris, A., Cantwell, A., Vogel, J., Santos, M., Miller, Z. A., Bettcher, B. M., Vessel, K. A., Kramer, J. H., Gorno-Tempini, M. L., Miller, B. L., Jagust, W. J., & Rabinovici, G. D. (2016). Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, *139*(Pt 5), 1551-1567. <https://doi.org/10.1093/brain/aww027>

Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacoheh, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, *12*(1), 19-30. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>

P

Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Navarrete, M., Esteban, J. A., Hernández, F., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2016). Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis. *The EMBO Journal*, *35*(13), 1417-1436. <https://doi.org/10.15252/embj.201593518>

Palmqvist, S., Janelidze, S., Quiroz, Y. T., Zetterberg, H., Lopera, F., Stomrud, E., Su, Y., Chen, Y., Serrano, G. E., Leuzy, A., Mattsson-Carlsson, N., Strandberg, O., Smith, R., Villegas, A., Sepulveda-Falla, D., Chai, X., Proctor, N. K., Beach, T. G., Blennow, K., ... Hansson, O. (2020). Discriminative

Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *JAMA*, 324(8), 772-781. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12134>

Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967-978. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)

Pang, B., Zhu, Y., Ni, J., Thompson, J., Malouf, D., Bucci, J., Graham, P., & Li, Y. (2020). Extracellular vesicles: The next generation of biomarkers for liquid biopsy-based prostate cancer diagnosis. *Theranostics*, 10(5), 2309-2326. <https://doi.org/10.7150/thno.39486>

Pase, M. P., Beiser, A. S., Himali, J. J., Satizabal, C. L., Aparicio, H. J., DeCarli, C., Chêne, G., Dufouil, C., & Seshadri, S. (2019). Assessment of Plasma Total Tau Level as a Predictive Biomarker for Dementia and Related Endophenotypes. *JAMA Neurology*, 76(5), 598-606. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.4666>

Peeraer, E., Bottelbergs, A., Van Kolen, K., Stancu, I.-C., Vasconcelos, B., Mahieu, M., Duytschaever, H., Ver Donck, L., Torremans, A., Sluydts, E., Van Acker, N., Kemp, J. A., Mercken, M., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., Dewachter, I., Lee, V. M. Y., & Moechars, D. (2015). Intracerebral injection of preformed synthetic tau fibrils initiates widespread tauopathy and neuronal loss in the brains of tau transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 73, 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.032>

Pérez, M., Avila, J., & Hernández, F. (2019). Propagation of Tau via Extracellular Vesicles. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 698. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00698>

Pérez, M., Valpuesta, J. M., Medina, M., Montejo de Garcini, E., & Avila, J. (1996). Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: The minimal sequence required for tau-tau interaction. *Journal of Neurochemistry*, 67(3), 1183-1190. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67031183.x>

Pérez-Fígares, J. M., Jimenez, A. J., & Rodríguez, E. M. (2001). Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microscopy Research and Technique*, 52(5), 591-607. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<591::AID-JEMT1043>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<591::AID-JEMT1043>3.0.CO;2-7)

Pernègre, C., Duquette, A., & Leclerc, N. (2019). Tau Secretion: Good and Bad for Neurons. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00649>

Peterson, D. W., Zhou, H., Dahlquist, F. W., & Lew, J. (2008). A Soluble Oligomer of Tau Associated with Fiber Formation Analyzed by NMR. *Biochemistry*, 47(28), 7393-7404. <https://doi.org/10.1021/bi702466a>

Piacentini, R., Puma, D. D. L., Mainardi, M., Lazzarino, G., Tavazzi, B., Arancio, O., & Grassi, C. (2017). Reduced gliotransmitter release from astrocytes mediates tau-induced synaptic dysfunction in cultured hippocampal neurons. *Glia*, 65(8), 1302-1316. <https://doi.org/10.1002/glia.23163>

Pick, A. (1892). Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prag Med Wochenschr*, 17, 165-167.

- Plouffe**, V., Mohamed, N.-V., Rivest-McGraw, J., Bertrand, J., Lauzon, M., & Leclerc, N. (2012). Hyperphosphorylation and Cleavage at D421 Enhance Tau Secretion. *PLoS ONE*, *7*(5), e36873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036873>
- Polanco**, J. C., Hand, G. R., Briner, A., Li, C., & Götz, J. (2021). Exosomes induce endolysosomal permeabilization as a gateway by which exosomal tau seeds escape into the cytosol. *Acta Neuropathologica*, *141*(2), 235-256. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02254-3>
- Polanco**, J. C., Li, C., Durisic, N., Sullivan, R., & Götz, J. (2018). Exosomes taken up by neurons hijack the endosomal pathway to spread to interconnected neurons. *Acta Neuropathologica Communications*, *6*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0514-4>
- Polanco**, J. C., Scicluna, B. J., Hill, A. F., & Götz, J. (2016). Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(24), 12445-12466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.709485>
- Pollock**, H., Hutchings, M., Weller, R. O., & Zhang, E. T. (1997). Perivascular spaces in the basal ganglia of the human brain: Their relationship to lacunes. *Journal of Anatomy*, *191* (Pt 3), 337-346. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19130337.x>
- Pollock**, N. J., Mirra, S. S., Binder, L. I., Hansen, L. A., & Wood, J. G. (1986). Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau. *Lancet (London, England)*, *2*(8517), 1211. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)92212-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)92212-9)
- Polydoro**, M., Dzhala, V. I., Pooler, A. M., Nicholls, S. B., McKinney, A. P., Sanchez, L., Pitstick, R., Carlson, G. A., Staley, K. J., Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2014). Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model. *Acta Neuropathologica*, *127*(2), 257-270. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1215-5>
- Pooler**, A. M., & Hanger, D. P. (2010). Functional implications of the association of tau with the plasma membrane. *Biochemical Society Transactions*, *38*(4), 1012-1015. <https://doi.org/10.1042/BST0381012>
- Pooler**, A. M., Phillips, E. C., Lau, D. H. W., Noble, W., & Hanger, D. P. (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Reports*, *14*(4), 389-394. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.15>
- Poorkaj**, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W. C., Raskind, M., & Schellenberg, G. D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals of Neurology*, *43*(6), 815-825. <https://doi.org/10.1002/ana.410430617>
- Popov**, K. I., Makepeace, K. A. T., Petrotchenko, E. V., Dokholyan, N. V., & Borchers, C. H. (2019). Insight into the Structure of the "Unstructured" Tau Protein. *Structure*, *27*(11), 1710-1715.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.09.003>
- Poulakis**, K., Pereira, J. B., Mecocci, P., Vellas, B., Tsolaki, M., Kłoszewska, I., Soininen, H., Lovestone, S., Simmons, A., Wahlund, L.-O., & Westman, E. (2018). Heterogeneous patterns of

brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 65, 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.009>

Price, D. L., & Sisodia, S. S. (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annual Review of Neuroscience*, 21, 479-505. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.479>

Price, J. L., Davis, P. B., Morris, J. C., & White, D. L. (1991). The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 12(4), 295-312. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(91\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(91)90006-6)

Probst, A., Tolnay, M., Langui, D., Goedert, M., & Spillantini, M. G. (1996). Pick's disease : Hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment. *Acta Neuropathologica*, 92(6), 588-596. <https://doi.org/10.1007/s004010050565>

Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4542), 136-144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>

Prusiner, S. B. (2013). Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annual Review of Genetics*, 47, 601-623. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155524>

R

Ramachandran, G., & Udgaonkar, J. B. (2013). Mechanistic Studies Unravel the Complexity Inherent in Tau Aggregation Leading to Alzheimer's Disease and the Tauopathies. *Biochemistry*, 52(24), 4107-4126. <https://doi.org/10.1021/bi400209z>

Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161-1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>

Rasmussen, M. K., Mestre, H., & Nedergaard, M. (2018). The glymphatic pathway in neurological disorders. *The Lancet. Neurology*, 17(11), 1016-1024. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30318-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30318-1)

Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors : Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847-856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>

Rauch, J. N., Chen, J. J., Sorum, A. W., Miller, G. M., Sharf, T., See, S. K., Hsieh-Wilson, L. C., Kampmann, M., & Kosik, K. S. (2018). Tau Internalization is Regulated by 6-O Sulfation on Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs). *Scientific Reports*, 8(1), 6382. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24904-z>

Rauch, J. N., Luna, G., Guzman, E., Audouard, M., Challis, C., Sibih, Y. E., Leshuk, C., Hernandez, I., Wegmann, S., Hyman, B. T., Gradinaru, V., Kampmann, M., & Kosik, K. S. (2020). LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. *Nature*, 580(7803), 381-385. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2156-5>

- Rebeck, G. W., & Hyman, B. T.** (1993). Neuroanatomical connections and specific regional vulnerability in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *14*(1), 45-47; discussion 55-56. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90019-8)
- Reilly, P., Winston, C. N., Baron, K. R., Trejo, M., Rockenstein, E. M., Akers, J. C., Kfoury, N., Diamond, M., Masliah, E., Rissman, R. A., & Yuan, S. H.** (2017). Novel human neuronal tau model exhibiting neurofibrillary tangles and transcellular propagation. *Neurobiology of Disease*, *106*, 222-234. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.06.005>
- Reynolds, C. H., Garwood, C. J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P. W., Varndell, I. M., Hanger, D. P., & Anderton, B. H.** (2008). Phosphorylation Regulates Tau Interactions with Src Homology 3 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Phospholipase C γ 1, Grb2, and Src Family Kinases *. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(26), 18177-18186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709715200>
- Richardson, J. C., Steele, J., & Olszewski, J.** (1963). SUPRANUCLEAR OPHTHALMOPLEGIA, PSEUDOBULBAR PALSY, NUCAL DYSTONIA AND DEMENTIA. A CLINICAL REPORT ON EIGHT CASES OF « HETEROGENOUS SYSTEM DEGENERATION ». *Transactions of the American Neurological Association*, *88*, 25-29.
- Richetin, K., Steullet, P., Pachoud, M., Perbet, R., Parietti, E., Maheswaran, M., Eddarkaoui, S., Bégard, S., Pythoud, C., Rey, M., Caillierez, R., Q Do, K., Halliez, S., Bezzi, P., Buée, L., Leuba, G., Colin, M., Toni, N., & Déglon, N.** (2020). Tau accumulation in astrocytes of the dentate gyrus induces neuronal dysfunction and memory deficits in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, *23*(12), 1567-1579. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00728-x>
- Ridder, K., Keller, S., Dams, M., Rupp, A.-K., Schlaudraff, J., Del Turco, D., Starmann, J., Macas, J., Karpova, D., Devraj, K., Depboylu, C., Landfried, B., Arnold, B., Plate, K. H., Höglinger, G., Sülmann, H., Altevogt, P., & Momma, S.** (2014). Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS Biology*, *12*(6), e1001874. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001874>
- Robinson, J. L., Lee, E. B., Xie, S. X., Rennert, L., Suh, E., Bredenberg, C., Caswell, C., Van Deerlin, V. M., Yan, N., Yousef, A., Hurtig, H. I., Siderowf, A., Grossman, M., McMillan, C. T., Miller, B., Duda, J. E., Irwin, D. J., Wolk, D., Elman, L., ... Trojanowski, J. Q.** (2018). Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated. *Brain: A Journal of Neurology*, *141*(7), 2181-2193. <https://doi.org/10.1093/brain/awy146>
- Rodriguez, G. A., Barrett, G. M., Duff, K. E., & Hussaini, S. A.** (2020). Chemogenetic attenuation of neuronal activity in the entorhinal cortex reduces A β and tau pathology in the hippocampus. *PLoS Biology*, *18*(8), e3000851. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000851>
- Rodriguez, L., Mohamed, N.-V., Desjardins, A., Lippé, R., Fon, E. A., & Leclerc, N.** (2017). Rab7A regulates tau secretion. *Journal of Neurochemistry*, *141*(4), 592-605. <https://doi.org/10.1111/jnc.13994>
- Rossi, G., Conconi, D., Panzeri, E., Redaelli, S., Piccoli, E., Paoletta, L., Dalprà, L., & Tagliavini, F.** (2013). Mutations in MAPT Gene Cause Chromosome Instability and Introduce Copy Number Variations Widely in the Genome. *Journal of Alzheimer's Disease*, *33*(4), 969-982. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121633>

Roy, S., Datta, C. K., Hirano, A., Ghatak, N. R., & Zimmerman, H. M. (1974). Electron microscopic study of neurofibrillary tangles in Steele-Richardson-Olszewski syndrome. *Acta Neuropathologica*, 29(2), 175-179. <https://doi.org/10.1007/BF00684775>

Ruan, Z., Pathak, D., Venkatesan Kalavai, S., Yoshii-Kitahara, A., Muraoka, S., Bhatt, N., Takamatsu-Yukawa, K., Hu, J., Wang, Y., Hersh, S., Ericsson, M., Gorantla, S., Gendelman, H. E., Kayed, R., Ikezu, S., Luebke, J. I., & Ikezu, T. (2021). Alzheimer's disease brain-derived extracellular vesicles spread tau pathology in interneurons. *Brain*, 144(1), 288-309. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa376>

Ryman, D. C., Acosta-Baena, N., Aisen, P. S., Bird, T., Danek, A., Fox, N. C., Goate, A., Frommelt, P., Ghetti, B., Langbaum, J. B. S., Lopera, F., Martins, R., Masters, C. L., Mayeux, R. P., McDade, E., Moreno, S., Reiman, E. M., Ringman, J. M., Salloway, S., ... Dominantly Inherited Alzheimer Network. (2014). Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 83(3), 253-260. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000596>

S

Sadallah, S., Eken, C., Martin, P. J., & Schifferli, J. A. (2011). Microparticles (Ectosomes) Shed by Stored Human Platelets Downregulate Macrophages and Modify the Development of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 186(11), 6543-6552. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002788>

Saijo, E., Ghetti, B., Zanusso, G., Oblak, A., Furman, J. L., Diamond, M. I., Kraus, A., & Caughey, B. (2017). Ultrasensitive and selective detection of 3-repeat tau seeding activity in Pick disease brain and cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathologica*, 133(5), 751-765. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1692-z>

Saijo, E., Metrick, M. A., Koga, S., Parchi, P., Litvan, I., Spina, S., Boxer, A., Rojas, J. C., Galasko, D., Kraus, A., Rossi, M., Newell, K., Zanusso, G., Grinberg, L. T., Seeley, W. W., Ghetti, B., Dickson, D. W., & Caughey, B. (2020). 4-Repeat tau seeds and templating subtypes as brain and CSF biomarkers of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathologica*, 139(1), 63-77. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02080-2>

Saint-Pol, J., Gosselet, F., Duban-Deweert, S., Pottiez, G., & Karamanos, Y. (2020). Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells*, 9(4), 851. <https://doi.org/10.3390/cells9040851>

Saito, Y., Ruberu, N. N., Sawabe, M., Arai, T., Tanaka, N., Kakuta, Y., Yamanouchi, H., & Murayama, S. (2004). Staging of Argyrophilic Grains: An Age-Associated Tauopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(9), 911-918. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.9.911>

Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Saman, S., Jackson, B., McKee, A. C., Alvarez, V. E., Lee, N. C. Y., & Hall, G. F. (2012). Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 3842-3849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277061>

- Sanders**, D. W., Kaufman, S. K., DeVos, S. L., Sharma, A. M., Mirbaha, H., Li, A., Barker, S. J., Foley, A. C., Thorpe, J. R., Serpell, L. C., Miller, T. M., Grinberg, L. T., Seeley, W. W., & Diamond, M. I. (2014). Distinct Tau Prion Strains Propagate in Cells and Mice and Define Different Tauopathies. *Neuron*, *82*(6), 1271-1288. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.047>
- Santa-Maria**, I., Varghese, M., Książak-Reding, H., Dzhun, A., Wang, J., & Pasinetti, G. M. (2012). Paired Helical Filaments from Alzheimer Disease Brain Induce Intracellular Accumulation of Tau Protein in Aggresomes. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(24), 20522-20533. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323279>
- Sato**, C., Barthélemy, N. R., Mawuenyega, K. G., Patterson, B. W., Gordon, B. A., Jockel-Balsarotti, J., Sullivan, M., Crisp, M. J., Kasten, T., Kirmess, K. M., Kanaan, N. M., Yarasheski, K. E., Baker-Nigh, A., Benzinger, T. L. S., Miller, T. M., Karch, C. M., & Bateman, R. J. (2018). Tau Kinetics in Neurons and the Human Central Nervous System. *Neuron*, *97*(6), 1284-1298.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.015>
- Satta**, N., Toti, F., Feugeas, O., Bohbot, A., Dachary-Prigent, J., Eschwège, V., Hedman, H., & Freyssinet, J. M. (1994). Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *153*(7), 3245-3255.
- Schneider**, J. A., Arvanitakis, Z., Bang, W., & Bennett, D. A. (2007). Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*, *69*(24), 2197-2204. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000271090.28148.24>
- Schöll**, M., Lockhart, S. N., Schonhaut, D. R., O'Neil, J. P., Janabi, M., Ossenkoppele, R., Baker, S. L., Vogel, J. W., Faria, J., Schwimmer, H. D., Rabinovici, G. D., & Jagust, W. J. (2016). PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain. *Neuron*, *89*(5), 971-982. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.028>
- Schreij**, A. M. A., Fon, E. A., & McPherson, P. S. (2016). Endocytic membrane trafficking and neurodegenerative disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *73*(8), 1529-1545. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2105-x>
- Schwarz**, A. J., Yu, P., Miller, B. B., Shcherbinin, S., Dickson, J., Navitsky, M., Joshi, A. D., Devous, M. D., & Mintun, M. S. (2016). Regional profiles of the candidate tau PET ligand 18F-AV-1451 recapitulate key features of Braak histopathological stages. *Brain: A Journal of Neurology*, *139*(Pt 5), 1539-1550. <https://doi.org/10.1093/brain/aww023>
- Sealey**, M. A., Vourkou, E., Cowan, C. M., Bossing, T., Quraishe, S., Grammenoudi, S., Skoulakis, E. M. C., & Mudher, A. (2017). Distinct phenotypes of three-repeat and four-repeat human tau in a transgenic model of tauopathy. *Neurobiology of Disease*, *105*, 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.003>
- Seitz**, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E.-M., Song, Y.-H., & Mandelkow, E. (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *The EMBO Journal*, *21*(18), 4896-4905. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf503>
- Selkoe**, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, *8*(6), 595-608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>

- Sepulcre**, J., Schultz, A. P., Sabuncu, M., Gomez-Isla, T., Chhatwal, J., Becker, A., Sperling, R., & Johnson, K. A. (2016). In Vivo Tau, Amyloid, and Gray Matter Profiles in the Aging Brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *36*(28), 7364-7374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0639-16.2016>
- Shafei**, R., Woollacott, I. O. C., Mummery, C. J., Bocchetta, M., Guerreiro, R., Bras, J., Warren, J. D., Lashley, T., Jaunmuktane, Z., & Rohrer, J. D. (2020). Two pathologically confirmed cases of novel mutations in the MAPT gene causing frontotemporal dementia. *Neurobiology of Aging*, *87*, 141.e15-141.e20. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.11.009>
- Shetty**, A. K., & Zanirati, G. (2020). The Interstitial System of the Brain in Health and Disease. *Aging and Disease*, *11*(1), 200. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0103>
- Shi**, Y., Zhang, W., Yang, Y., Murzin, A., Falcon, B., Kotecha, A., van Beers, M., Tarutani, A., Kametani, F., Garringer, H. J., Vidal, R., Hallinan, G. I., Lashley, T., Saito, Y., Murayama, S., Yoshida, M., Tanaka, H., Kakita, A., Ikeuchi, T., ... Scheres, S. H. W. (2021). *Structure-based Classification of Tauopathies* [Preprint]. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/2021.05.28.446130>
- Simón**, D., García-García, E., Royo, F., Falcón-Pérez, J. M., & Avila, J. (2012). Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Letters*, *586*(1), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.11.022>
- Sims**, P. J., Faioni, E. M., Wiedmer, T., & Shattil, S. J. (1988). Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(34), 18205-18212.
- Skachokova**, Z., Martinisi, A., Flach, M., Sprenger, F., Naegelin, Y., Steiner-Monard, V., Sollberger, M., Monsch, A. U., Goedert, M., Tolnay, M., & Winkler, D. T. (2019). Cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients promotes tau aggregation in transgenic mice. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0725-3>
- Skibinski**, G., Parkinson, N. J., Brown, J. M., Chakrabarti, L., Lloyd, S. L., Hummerich, H., Nielsen, J. E., Hodges, J. R., Spillantini, M. G., Thusgaard, T., Brandner, S., Brun, A., Rossor, M. N., Gade, A., Johannsen, P., Sørensen, S. A., Gydesen, S., Fisher, E. M. C., & Collinge, J. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nature Genetics*, *37*(8), 806-808. <https://doi.org/10.1038/ng1609>
- Skog**, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Carter, R. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, *10*(12), 1470-1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>
- Small**, S. A., Simoes-Spassov, S., Mayeux, R., & Petsko, G. A. (2017). Endosomal Traffic Jams Represent a Pathogenic Hub and Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Trends in Neurosciences*, *40*(10), 592-602. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.08.003>
- Smolek**, T., Jadhav, S., Brezovakova, V., Cubinkova, V., Valachova, B., Novak, P., & Zilka, N. (2019). First-in-Rat Study of Human Alzheimer's Disease Tau Propagation. *Molecular Neurobiology*, *56*(1), 621-631. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1102-0>

Soares, A. C., Ferreira, A., Mariën, J., Delay, C., Lee, E., Trojanowski, J. Q., Moechars, D., Annaert, W., & De Muynck, L. (2021). PIKfyve activity is required for lysosomal trafficking of tau aggregates and tau seeding. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100636. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100636>

Sokolow, S., Henkins, K. M., Bilousova, T., Gonzalez, B., Vinters, H. V., Miller, C. A., Cornwell, L., Poon, W. W., & Gylys, K. H. (2015). Pre-synaptic C-terminal truncated tau is released from cortical synapses in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 133(3), 368-379. <https://doi.org/10.1111/jnc.12991>

Sotiropoulos, I., Galas, M.-C., Silva, J. M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M. B., Blum, D., Sayas, C. L., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Spillantini, M. G., Sousa, N., Avila, J., Medina, M., Mudher, A., & Buee, L. (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0489-6>

ottejeau, Y., Bretteville, A., Cantrelle, F.-X., Malmanche, N., Demiaute, F., Mendes, T., Delay, C., Alves Dos Alves, H., Flaig, A., Davies, P., Dourlen, P., Dermaut, B., Laporte, J., Amouyel, P., Lippens, G., Chapuis, J., Landrieu, I., & Lambert, J.-C. (2015). Tau phosphorylation regulates the interaction between BIN1's SH3 domain and Tau's proline-rich domain. *Acta Neuropathologica Communications*, 3(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0237-8>

Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A., & Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7737-7741.

Spires-Jones, T. L., Kopeikina, K. J., Koffie, R. M., de Calignon, A., & Hyman, B. T. (2011). Are Tangles as Toxic as They Look? *Journal of Molecular Neuroscience*, 45(3), 438-444. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9566-7>

Stancu, I.-C., Vasconcelos, B., Ris, L., Wang, P., Villers, A., Peeraer, E., Buist, A., Terwel, D., Baatsen, P., Oyelami, T., Pierrot, N., Casteels, C., Bormans, G., Kienlen-Campard, P., Octave, J.-N., Moechars, D., & Dewachter, I. (2015). Templated misfolding of Tau by prion-like seeding along neuronal connections impairs neuronal network function and associated behavioral outcomes in Tau transgenic mice. *Acta Neuropathologica*, 129(6), 875-894. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1413-4>

Steele, J., Richardson, J., & Olszewski, J. (2014). Progressive Supranuclear Palsy: A Heterogeneous Degeneration Involving the Brain Stem, Basal Ganglia and Cerebellum With Vertical Gaze and Pseudobulbar Palsy, Nuchal Dystonia and Dementia. *Seminars in Neurology*, 34(02), 129-150. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1377058>

Stein, J. M., & Luzio, J. P. (1991). Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochemical Journal*, 274(2), 381-386. <https://doi.org/10.1042/bj2740381>

Stern, R. A., Tripodis, Y., Baugh, C. M., Fritts, N. G., Martin, B. M., Chaisson, C., Cantu, R. C., Joyce, J. A., Shah, S., Ikezu, T., Zhang, J., Gercel-Taylor, C., & Taylor, D. D. (2016). Preliminary Study of Plasma Exosomal Tau as a Potential Biomarker for Chronic Traumatic Encephalopathy. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 51(4), 1099-1109. <https://doi.org/10.3233/JAD-151028>

Stopschinski, B. E., & Diamond, M. I. (2017). The prion model for progression and diversity of neurodegenerative diseases. *The Lancet Neurology*, 16(4), 323-332. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30037-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30037-6)

Stopschinski, B. E., Holmes, B. B., Miller, G. M., Manon, V. A., Vaquer-Alicea, J., Prueitt, W. L., Hsieh-Wilson, L. C., & Diamond, M. I. (2018). Specific glycosaminoglycan chain length and sulfation patterns are required for cell uptake of tau versus α -synuclein and β -amyloid aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10826-10840. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000378>

Su, H., Rustam, Y. H., Masters, C. L., Makalic, E., McLean, C. A., Hill, A. F., Barnham, K. J., Reid, G. E., & Vella, L. J. (2021). Characterization of brain-derived extracellular vesicle lipids in Alzheimer's disease. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(7). <https://doi.org/10.1002/jev2.12089>

Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., Colin, M., Bonnefoy, E., Buée, L., & Galas, M.-C. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4566-4575. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>

Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neurology*, 14(3), 133-150. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>

T

Takahashi, M., Miyata, H., Kametani, F., Nonaka, T., Akiyama, H., Hisanaga, S., & Hasegawa, M. (2015). Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathologica*, 129(6), 895-907. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1415-2>

Takeda, S., Commins, C., DeVos, S. L., Nobuhara, C. K., Wegmann, S., Roe, A. D., Costantino, I., Fan, Z., Nicholls, S. B., Sherman, A. E., Trisini Lipsanopoulos, A. T., Scherzer, C. R., Carlson, G. A., Pitstick, R., Peskind, E. R., Raskind, M. A., Li, G., Montine, T. J., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2016). Seed-competent high-molecular-weight tau species accumulates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease mouse model and human patients. *Annals of Neurology*, 80(3), 355-367. <https://doi.org/10.1002/ana.24716>

Takeda, S., Wegmann, S., Cho, H., DeVos, S. L., Commins, C., Roe, A. D., Nicholls, S. B., Carlson, G. A., Pitstick, R., Nobuhara, C. K., Costantino, I., Frosch, M. P., Müller, D. J., Irimia, D., & Hyman, B. T. (2015). Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nature Communications*, 6(1), 8490. <https://doi.org/10.1038/ncomms9490>

Tan, J. Z. A., & Gleeson, P. A. (2019). The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1861(4), 697-712. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.013>

- Tang, Z.,** Ioja, E., Bereczki, E., Hultenby, K., Li, C., Guan, Z., Winblad, B., & Pei, J.-J. (2015). mTor mediates tau localization and secretion: Implication for Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1853(7), 1646-1657. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.003>
- Tang-Wai, D. F.,** Graff-Radford, N. R., Boeve, B. F., Dickson, D. W., Parisi, J. E., Crook, R., Caselli, R. J., Knopman, D. S., & Petersen, R. C. (2004). Clinical, genetic, and neuropathologic characteristics of posterior cortical atrophy. *Neurology*, 63(7), 1168-1174. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000140289.18472.15>
- Taniguchi-Watanabe, S.,** Arai, T., Kametani, F., Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Tarutani, A., Murayama, S., Saito, Y., Arima, K., Yoshida, M., Akiyama, H., Robinson, A., Mann, D. M. A., Iwatsubo, T., & Hasegawa, M. (2016). Biochemical classification of tauopathies by immunoblot, protein sequence and mass spectrometric analyses of sarkosyl-insoluble and trypsin-resistant tau. *Acta Neuropathologica*, 131(2), 267-280. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1503-3>
- Tapiola, T.,** Alafuzoff, I., Herukka, S.-K., Parkkinen, L., Hartikainen, P., Soininen, H., & Pirttilä, T. (2009). Cerebrospinal Fluid β -Amyloid 42 and Tau Proteins as Biomarkers of Alzheimer-Type Pathologic Changes in the Brain. *ARCH NEUROL*, 66(3), 8.
- Tardivel, M.,** Bégard, S., Bousset, L., Dujardin, S., Coens, A., Melki, R., Buée, L., & Colin, M. (2016). Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>
- Tashiro, K.,** Hasegawa, M., Ihara, Y., & Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport*, 8(12), 2797-2801. <https://doi.org/10.1097/00001756-199708180-00029>
- Tatebe, H.,** Kasai, T., Ohmichi, T., Kishi, Y., Kakeya, T., Waragai, M., Kondo, M., Allsop, D., & Tokuda, T. (2017). Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology: Pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and down syndrome. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0206-8>
- Tato, R. E.,** Frank, A., & Hernanz, A. (1995). Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 59(3), 280-283. <https://doi.org/10.1136/jnnp.59.3.280>
- Tellez-Nagel, I.,** & Wiśniewski, H. M. (1973). Ultrastructure of neurofibrillary tangles in Steele-Richardson-Olszewski syndrome. *Archives of Neurology*, 29(5), 324-327. <https://doi.org/10.1001/archneur.1973.00490290064007>
- Telling, G. C.,** Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., & Prusiner, S. B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5295), 2079-2082. <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2079>
- Thal, D. R.,** Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800. <https://doi.org/10.1212/wnl.58.12.1791>

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). 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. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Thijssen, E. H., La Joie, R., Wolf, A., Strom, A., Wang, P., Iaccarino, L., Bourakova, V., Cobigo, Y., Heuer, H., Spina, S., VandeVrede, L., Chai, X., Proctor, N. K., Airey, D. C., Shcherbinin, S., Duggan Evans, C., Sims, J. R., Zetterberg, H., Blennow, K., ... Advancing Research and Treatment for Frontotemporal Lobar Degeneration (ARTFL) investigators. (2020). Diagnostic value of plasma phosphorylated tau181 in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Nature Medicine*, 26(3), 387-397. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0762-2>

Tkach, M., Kowal, J., Zucchetti, A. E., Enserink, L., Jouve, M., Lankar, D., Saitakis, M., Martin-Jaular, L., & Théry, C. (2017). Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. *The EMBO Journal*, 36(20), 3012-3028. <https://doi.org/10.15252/emboj.201696003>

Tominaga, N., Kosaka, N., Ono, M., Katsuda, T., Yoshioka, Y., Tamura, K., Lötvall, J., Nakagama, H., & Ochiya, T. (2015). Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nature Communications*, 6, 6716. <https://doi.org/10.1038/ncomms7716>

Torralba, D., Baixauli, F., Villarroya-Beltri, C., Fernández-Delgado, I., Latorre-Pellicer, A., Acín-Pérez, R., Martín-Cófreces, N. B., Jaso-Tamame, Á. L., Iborra, S., Jorge, I., González-Aseguinolaza, G., Garaude, J., Vicente-Manzanares, M., Enríquez, J. A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2018). Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nature Communications*, 9(1), 2658. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05077-9>

Trabzuni, D., Wray, S., Vandrovcova, J., Ramasamy, A., Walker, R., Smith, C., Luk, C., Gibbs, J. R., Dillman, A., Hernandez, D. G., Arepalli, S., Singleton, A. B., Cookson, M. R., Pittman, A. M., de Silva, R., Weale, M. E., Hardy, J., & Ryten, M. (2012). MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: Relation to genotype and implication for tauopathies. *Human Molecular Genetics*, 21(18), 4094-4103. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds238>

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1244-1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>

Trojanowski, J. Q., Schuck, T., Schmidt, M. L., & Lee, V. M. (1989). Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 37(2), 209-215. <https://doi.org/10.1177/37.2.2492045>

U

Usenovic, M., Niroomand, S., Drolet, R. E., Yao, L., Gaspar, R. C., Hatcher, N. G., Schachter, J., Renger, J. J., & Parmentier-Batteur, S. (2015). Internalized Tau Oligomers Cause Neurodegeneration by Inducing Accumulation of Pathogenic Tau in Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(42), 14234-14250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1523-15.2015>

V

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654-659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>

Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C., & Sleegers, K. (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease : Clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 18(5), 421-430. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.117>

Vandermeeren, M., Mercken, M., Vanmechelen, E., Six, J., van de Voorde, A., Martin, J. J., & Cras, P. (1993). Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Neurochemistry*, 61(5), 1828-1834. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb09823.x>

van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>

Vella, L. J., Sharples, R. A., Lawson, V. A., Masters, C. L., Cappai, R., & Hill, A. F. (2007). Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *The Journal of Pathology*, 211(5), 582-590. <https://doi.org/10.1002/path.2145>

Verny, M., Jellinger, K. A., Hauw, J. J., Bancher, C., Litvan, I., & Agid, Y. (1996). Progressive supranuclear palsy: A clinicopathological study of 21 cases. *Acta Neuropathologica*, 91(4), 427-431. <https://doi.org/10.1007/s004010050446>

Violet, M., Chauderlier, A., Delattre, L., Tardivel, M., Chouala, M. S., Sultan, A., Marciniak, E., Humez, S., Binder, L., Kaye, R., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., Buée, L., & Galas, M.-C. (2015). Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo. *Neurobiology of Disease*, 82, 540-551. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.09.003>

Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nessler, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., Buée, L., & Galas, M.-C. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 84. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00084>

Vogel, J. W., Iturria-Medina, Y., Strandberg, O. T., Smith, R., Levitis, E., Evans, A. C., & Hansson, O. (2020). Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease. *Nature Communications*, *11*(1), 2612. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15701-2>

Vogel, J. W., Young, A. L., Oxtoby, N. P., Smith, R., Ossenkoppele, R., Strandberg, O. T., La Joie, R., Aksman, L. M., Grothe, M. J., Iturria-Medina, Y., Pontecorvo, M. J., Devous, M. D., Rabinovici, G. D., Alexander, D. C., Lyoo, C. H., Evans, A. C., & Hansson, O. (2021). Four distinct trajectories of tau deposition identified in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, *27*(5), 871-881. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01309-6>

W

Walker, L. C., & Jucker, M. (2015). Neurodegenerative diseases : Expanding the prion concept. *Annual Review of Neuroscience*, *38*, 87-103. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033828>

Wang, A., Wang, R., Cui, D., Huang, X., Yuan, L., Liu, H., Fu, Y., Liang, L., Wang, W., He, Q., Shi, C., Guan, X., Teng, Z., Zhao, G., Li, Y., Gao, Y., & Han, H. (2019). The Drainage of Interstitial Fluid in the Deep Brain is Controlled by the Integrity of Myelination. *Aging and Disease*, *10*(5), 937-948. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.1206>

Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., Chandupatla, R., Maetzler, W., Schneider, A., Mandelkow, E., & Mandelkow, E.-M. (2017). The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>

Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Krüger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E.-M., Cuervo, A. M., & Mandelkow, E. (2009). Tau fragmentation, aggregation and clearance : The dual role of lysosomal processing. *Human Molecular Genetics*, *18*(21), 4153-4170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp367>

Wegmann, S., Bennett, R. E., Amaral, A. S., & Hyman, B. T. (2017). Studying tau protein propagation and pathology in the mouse brain using adeno-associated viruses. *Methods in Cell Biology*, *141*, 307-322. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.06.014>

Wegmann, S., Maury, E. A., Kirk, M. J., Saqran, L., Roe, A., DeVos, S. L., Nicholls, S., Fan, Z., Takeda, S., Cagsal-Getkin, O., William, C. M., Spires-Jones, T. L., Pitstick, R., Carlson, G. A., Pooler, A. M., & Hyman, B. T. (2015). Removing endogenous tau does not prevent tau propagation yet reduces its neurotoxicity. *The EMBO Journal*, *34*(24), 3028-3041. <https://doi.org/10.15252/embj.201592748>

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(5), 1858-1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>

Whitwell, J. L., Dickson, D. W., Murray, M. E., Weigand, S. D., Tosakulwong, N., Senjem, M. L., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Parisi, J. E., Petersen, R. C., Jack, C. R., & Josephs, K. A. (2012).

Neuroimaging correlates of pathologically-defined atypical Alzheimer's disease. *Lancet neurology*, 11(10), 868-877. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70200-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70200-4)

Wilhelmsen, K. C., Lynch, T., Pavlou, E., Higgins, M., & Nygaard, T. G. (1994). Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *American Journal of Human Genetics*, 55(6), 1159-1165.

Williams, D. R., Holton, J. L., Strand, C., Pittman, A., de Silva, R., Lees, A. J., & Revesz, T. (2007). Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain*, 130(6), 1566-1576. <https://doi.org/10.1093/brain/awm104>

Williamson, R., Scales, T., Clark, B. R., Gibb, G., Reynolds, C. H., Kellie, S., Bird, I. N., Varndell, I. M., Sheppard, P. W., Everall, I., & Anderton, B. H. (2002). Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: Involvement of Src family protein kinases. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), 10-20.

Willms, E., Johansson, H. J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K. E. M., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C. I. E., Lehtiö, J., EL Andaloussi, S., Wood, M. J. A., & Vader, P. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports*, 6(1), 22519. <https://doi.org/10.1038/srep22519>

Wilson, D. M., & Binder, L. I. (1997). Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 150(6), 2181-2195.

Wiltfang, J., Esselmann, H., Bibl, M., Hüll, M., Hampel, H., Kessler, H., Frölich, L., Schröder, J., Peters, O., Jessen, F., Luckhaus, C., Perneczky, R., Jahn, H., Fiszer, M., Maler, J. M., Zimmermann, R., Bruckmoser, R., Kornhuber, J., & Lewczuk, P. (2007). Amyloid β peptide ratio 42/40 but not A β 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A β 40 load. *Journal of Neurochemistry*, 101(4), 1053-1059. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04404.x>

Winston, C. N., Aulston, B., Rockenstein, E. M., Adame, A., Prikhodko, O., Dave, K. N., Mishra, P., Rissman, R. A., & Yuan, S. H. (2019). Neuronal Exosome-Derived Human Tau is Toxic to Recipient Mouse Neurons in vivo. *Journal of Alzheimer's Disease*, 67(2), 541-553. <https://doi.org/10.3233/JAD-180776>

Winston, C. N., Goetzl, E. J., Akers, J. C., Carter, B. S., Rockenstein, E. M., Galasko, D., Masliah, E., & Rissman, R. A. (2016). Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 3(1), 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2016.04.001>

Winston, C. N., Romero, H. K., Ellisman, M., Nauss, S., Julovich, D. A., Conger, T., Hall, J. R., Campana, W., O'Bryant, S. E., Nievergelt, C. M., Baker, D. G., Risbrough, V. B., & Rissman, R. A. (2019). Assessing Neuronal and Astrocyte Derived Exosomes From Individuals With Mild Traumatic Brain Injury for Markers of Neurodegeneration and Cytotoxic Activity. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1005. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01005>

Woerman, A. L., Aoyagi, A., Patel, S., Kazmi, S. A., Lobach, I., Grinberg, L. T., McKee, A. C., Seeley, W. W., Olson, S. H., & Prusiner, S. B. (2016). Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(50), E8187-E8196. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616344113>

Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, *13*(3), 269-288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>

Wu, J. W., Herman, M., Liu, L., Simoes, S., Acker, C. M., Figueroa, H., Steinberg, J. I., Margittai, M., Kayed, R., Zurzolo, C., Di Paolo, G., & Duff, K. E. (2013). Small Misfolded Tau Species Are Internalized via Bulk Endocytosis and Anterogradely and Retrogradely Transported in Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(3), 1856-1870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394528>

Wu, J. W., Hussaini, S. A., Bastille, I. M., Rodriguez, G. A., Mrejeru, A., Rilett, K., Sanders, D. W., Cook, C., Fu, H., Boonen, R. A. C. M., Herman, M., Nahmani, E., Emrani, S., Figueroa, Y. H., Diamond, M. I., Clelland, C. L., Wray, S., & Duff, K. E. (2016). Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nature Neuroscience*, *19*(8), 1085-1092. <https://doi.org/10.1038/nn.4328>

Wu, L., Rosa-Neto, P., Hsiung, G.-Y. R., Sadovnick, A. D., Masellis, M., Black, S. E., Jia, J., & Gauthier, S. (2012). Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, *39*(4), 436-445. <https://doi.org/10.1017/s0317167100013949>

X

Xu, C., Guo, J., Li, L., Wang, X., Zhou, Q., Sun, D., Zhang, S., Li, S., Ye, J., Liu, Y., Liu, E., Zeng, P., Wang, X., Yang, Y., & Wang, J.-Z. (2020). Co-Expression of Three Wild-Type 3R-Tau Isoforms Induces Memory Deficit via Oxidation-Related DNA Damage and Cell Death: A Promising Model for Tauopathies. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *73*(3), 1105-1123. <https://doi.org/10.3233/JAD-191132>

Xu, J., Patassini, S., Rustogi, N., Riba-Garcia, I., Hale, B. D., Phillips, A. M., Waldvogel, H., Haines, R., Bradbury, P., Stevens, A., Faull, R. L. M., Dowsey, A. W., Cooper, G. J. S., & Unwin, R. D. (2019). Regional protein expression in human Alzheimer's brain correlates with disease severity. *Communications Biology*, *2*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0254-9>

Xu, M., Lu, M., Zhang, W., Jin, Q., & Chen, Y. (2021). Simultaneous Detection of Six Isoforms of Tau Protein in Human Cerebrospinal Fluid by Multidimensional Mass Spectrometry-Based Targeted Proteomics. *Journal of Proteome Research*, *20*(5), 2299-2307. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00826>

Y

Yamada, K., Cirrito, J. R., Stewart, F. R., Jiang, H., Finn, M. B., Holmes, B. B., Binder, L. I., Mandelkow, E.-M., Diamond, M. I., Lee, V. M.-Y., & Holtzman, D. M. (2011). In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau

transgenic mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(37), 13110-13117. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2569-11.2011>

Yamada, K., Holth, J. K., Liao, F., Stewart, F. R., Mahan, T. E., Jiang, H., Cirrito, J. R., Patel, T. K., Hochgräfe, K., Mandelkow, E.-M., & Holtzman, D. M. (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(3), 387-393. <https://doi.org/10.1084/jem.20131685>

Yamada, T., McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1992). Appearance of paired nucleated, Tau-positive glia in patients with progressive supranuclear palsy brain tissue. *Neuroscience Letters*, 135(1), 99-102. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90145-w](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90145-w)

Yanamandra, K., Kfoury, N., Jiang, H., Mahan, T. E., Ma, S., Maloney, S. E., Wozniak, D. F., Diamond, M. I., & Holtzman, D. M. (2013). Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding in vitro markedly decrease pathology and improve cognition in vivo. *Neuron*, 80(2), 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.046>

Yao, J., Irwin, R. W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R. T., & Brinton, R. D. (2009). Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14670-14675. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903563106>

Yao, Y., Fang, X., Yuan, J., Qin, F., Yu, T., Xia, D., Li, Z., & Lai, N. (2021). Interleukin-6 in Cerebrospinal Fluid Small Extracellular Vesicles as a Potential Biomarker for Prognosis of Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 17, 1423-1431. <https://doi.org/10.2147/NDT.S304394>

Yoshida, H., & Goedert, M. (2002). Molecular Cloning and Functional Characterization of Chicken Brain Tau: Isoforms with up to Five Tandem Repeats †. *Biochemistry*, 41(51), 15203-15211. <https://doi.org/10.1021/bi026464m>

Yoshida, H., & Goedert, M. (2006). Sequential phosphorylation of tau protein by cAMP-dependent protein kinase and SAPK4/p38delta or JNK2 in the presence of heparin generates the AT100 epitope. *Journal of Neurochemistry*, 99(1), 154-164. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04052.x>

Yoshioka, K., Miki, T., Katsuya, T., Ogihara, T., & Sakaki, Y. (1991). The 717Val—Ile substitution in amyloid precursor protein is associated with familial Alzheimer's disease regardless of ethnic groups. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178(3), 1141-1146. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91011-z](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91011-z)

You, Y., & Ikezu, T. (2019). Emerging roles of extracellular vesicles in neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*, 130, 104512. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104512>

Yousif, G., Qadri, S., Haik, M., Haik, Y., Parray, A. S., & Shuaib, A. (2021). Circulating Exosomes of Neuronal Origin as Potential Early Biomarkers for Development of Stroke. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 25(2), 163-180. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00508-0>

Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., & Nixon, R. A. (2008). Axonal Transport Rates In Vivo Are Unaffected by Tau Deletion or Overexpression in Mice. *The Journal of Neuroscience*, *28*(7), 1682-1687. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5242-07.2008>

Yuyama, K., Sun, H., Usuki, S., Sakai, S., Hanamatsu, H., Mioka, T., Kimura, N., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J., Fujitani, N., Shinohara, Y., & Igarashi, Y. (2015). A potential function for neuronal exosomes : Sequestering intracerebral amyloid- β peptide. *FEBS Letters*, *589*(1), 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.027>

Yuyama, K., Yamamoto, N., & Yanagisawa, K. (2008). Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality : Another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *Journal of Neurochemistry*, *105*(1), 217-224. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05128.x>

Z

Zempel, H., & Mandelkow, E.-M. (2015). Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration : Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia. *Molecular Neurodegeneration*, *10*(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0064-1>

Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., & Mandelkow, E.-M. (2010). A β Oligomers Cause Localized Ca²⁺ Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines. *Journal of Neuroscience*, *30*(36), 11938-11950. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010>

Zhang, J. Y., Liu, S. J., Li, H. L., & Wang, J.-Z. (2005). Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/Mg(2+)-dependent proteasome protease system. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *112*(4), 547-555. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0196-x>

Zhang, W., Falcon, B., Murzin, A. G., Fan, J., Crowther, R. A., Goedert, M., & Scheres, S. H. (2019). Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer's and Pick's diseases. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.43584>

Zhang, W., Tarutani, A., Newell, K. L., Murzin, A. G., Matsubara, T., Falcon, B., Vidal, R., Garringer, H. J., Shi, Y., Ikeuchi, T., Murayama, S., Ghetti, B., Hasegawa, M., Goedert, M., & Scheres, S. H. W. (2020). Novel tau filament fold in corticobasal degeneration. *Nature*, *580*(7802), 283-287. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2043-0>

Zheng-Fischhöfer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Illenberger, S., Godemann, R., & Mandelkow, E. (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3 β and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *European Journal of Biochemistry*, *252*(3), 542-552. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520542.x>

Zuo, L., Li, K., & Han, H. (2015). Comparative Analysis by Magnetic Resonance Imaging of Extracellular Space Diffusion and Interstitial Fluid Flow in the Rat Striatum and Thalamus. *Applied Magnetic Resonance*, *46*(6), 623-632. <https://doi.org/10.1007/s00723-015-0670-7>

ANNEXES

Cohorte ecTAUsome (critères d'inclusion et d'exclusion)

Tableau 4 : Critères d'inclusion et d'exclusion communs aux 5 groupes pour la cohorte ecTAUsome.

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
<ul style="list-style-type: none"> - Hommes et femmes capables de lire et d'écrire âgés de 50 à 80 ans inclus au moment de la visite de sélection et pouvant rentrer dans l'un des 5 groupes - Sujets à même de subir une ponction lombaire. - Sujets ayant un accompagnant. - Sujets et accompagnants 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. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sujets présentant une démence liée à une pathologie non dégénérative, incluant les démences vasculaires ; - Maladies associées : <ul style="list-style-type: none"> ○ Sujets présentant une autre pathologie neurodégénérative, notamment une démence fronto-temporale, une démence à corps de Lewy 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 : <ul style="list-style-type: none"> ○ Sujets présentant une pathologie connue due aux virus suivants : Virus de l'hépatite C, virus de l'hépatite B, virus de l'immunodéficience humaine ○ Sujets présentant des anomalies biologiques cliniquement significatives, selon le jugement de l'investigateur - Autres : <ul style="list-style-type: none"> ○ 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)

Tableau 5 : Critères d'inclusion spécifiques aux groupes dans la cohorte ecTAUsome.

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 (non MCI)	Présence d'une plainte cognitive Absence de trouble cognitif objectivé par un score MMSE >27 et un examen neuropsychologique standard normal (évaluation < 1 an)
4- Déficit cognitif léger (MCI)	Troubles significatifs de la mémoire épisodique d'apparition progressive depuis plus de 6 mois Au moins un des critères suivants : <ul style="list-style-type: none">- Atrophie médiale temporale sur imagerie IRM- Concentration diminuée de la protéine Aβ42 et concentration augmentée de la protéine tau dans le LCS- Hypométabolisme bilatéral temporo-pariétal visible en TEP-FDG- Marquage amyloïde positif en TEP si disponible Exclusion d'autres diagnostics différentiels
5- Démence de type Alzheimer	Déclin cognitive significatif et progressif depuis plus de 6 mois Présentation amnésique ou multidomaine Exclusion d'autres diagnostics différentiels

Données démographiques et cliniques

Tableau 6 : Données démographiques, cliniques et biologiques des patients donneurs pour la préparation du fluide cérébral. Le fluide préfrontal des patients en gras a été utilisé pour les injections stéréotaxiques. Ctrl : n=5, MA : n=10, PSP : n=10, Pick : n=5.

Sexe	Âge	DPM (h)	Diagnostic	Inclusions tau	Braak	Thal	Cause du décès
M	78	19	Ctrl	Aucune	0	0	Aspergillose invasive
F	82		Ctrl	Aucune	I	1	péricardite
M	23	24	Ctrl	Aucune	0	0	myocardite
M	59	13	Ctrl	Aucune	0	0	Choc septique
M	41	11	Ctrl	Aucune	0	0	suffocation
M	70	30	MA	DNF	VI	4	
F	63	15	MA	DNF	VI	4	
F	60	24	MA	DNF	VI	5	
F	82	84	MA	DNF	VI	5	
F	87	24	MA	DNF	VI	5	
F	71	4	MA	DNF	VI	4	
M	64	20	MA	DNF	VI	4	
M	66	27	MA	DNF	VI	5	
F	66	16	MA	DNF	VI	4	
M	69	6	MA	DNF	VI	4	
M	74	9	PSP	DNF + glial		1	
M	90	36	PSP	DNF + glial		2	
M	88	3	PSP	DNF + glial		4	
M	69	17	PSP	DNF + glial		0	
F	79	4	PSP	DNF + glial		0	
M	65	18	PSP	DNF + glial		0	
M	82	4	PSP	DNF + glial		0	
M	64	18	PSP	DNF + glial		0	
F	77	9	PSP	DNF + glial		3	
M	57	20	PSP	DNF + glial		1	
M	57	22	Pick	Corps de Pick		0	
M	71	21	Pick	Corps de Pick		3	
F	78	11	Pick	Corps de Pick + DNF		0	
M	68	15	Pick	Corps de Pick		0	
M	68	8	Pick	Corps de Pick		0	

Tableau 7 : Données démographiques, cliniques et biologiques des patients non MA donneurs de LCS ante-mortem. N=32

Diagnostic	Sexe	Âge	MMS E	A β 40 (pg/mL)	A β 42 (pg/ml)	A β 42/40	Tau (pg/ml)	ptau (pg/ml)
Angiopathie amyloïde cérébrale	M	71	19/30		697		271	47
Maladie psychiatrique	M	51	20/30		1420		259	54
Démence vasculaire	F	79	24/30		1658		411	65
MCI amnésique non MA	F	43	25/30		1216		186	44
Psychose maniaco- dépressive	M	54	28/30		1374		248	53
Syndrome post- commotionnel	M	55	18/30		1317		221	46
Toxique	F	66	20/30		968		306	57
DFT probable	M	66	22/30	6082	692	0.114	296	61
DFT	M	71	18/30	7668	606	0.079	290	59
DFT	M	61	20/30		879		245	28
DFT possible - non MA	M	75	30/30		1546		248	45
DFT	F	63	22/30		1525		263	48
Démence vasculaire - maladie congénitale	M	86	21/30	13207	746	0.056	355	62
Maladie de Parkinson	M	72	25/30		905		314	56
DCB	F	62	17/30	6009	648	0.108	390	55
DCB	M	42	MOCA 21/30		741		108	23
Non MA (psychiatrique ou vasculaire)	M	53	14/30		1110		217	45
DCB	M	74	22/28	3637	645	0.177	176	29
DFT	M	53	24/30		1306		357	52
DFT	M	67	27/30		854		393	52
Maladie psychiatrique	F	46	26/30	14632	1580	0.108	375	71
Cause vasculaire	F	71	18/28		1301		230	43
Non MA	F	87	21/30	11508	963	0.084	557	72
Non MA	F	62	23/30		1188		143	31
Non MA	M	58	19/30		897		133	28
DFT	F	56	22/30		1046		289	39
Maladie psychiatrique	F	39	?		1017		150	34
DFT	M	67	25/30		1193		234	41
MCI non MA	F	62	24/30	12720	1282	0.101	319	61
DCB	M	66	24/30		1116		211	42
MCI vasculaire	M	63	27/30	17926	1664	0.093	392	72
MCI non MA	F	54	26/30		1598		267	54

Tableau 8 : Données démographiques et biologiques des patients MA donateurs de LCS ante-mortem. N=35

Sexe	Âge	A β 40 (pg/mL)	A β 42 (pg/ml)	A β 42/40	Tau (pg/ml)	ptau (pg/ml)
F	75	11432	700	0.061	623	102
F	71		518		918	109
M	60		490		656	94
F	59		635		947	109
M	66		600		1001	139
F	75	8065	790	0.098	504	84
F	79		574		481	79
F	65	11978	830	0.069	1106	151
F	44	14245	464	0.033	>2491	275
M	62	10549	825	0.078	472	80
F	74		581		842	108
F	74		816		579	98
F	58		532		939	119
F	77		513		542	84
M	66	8659	701	0.081	514	74
M	63	9926	770	0.078	457	62
M	64		678		500	80
F	50	13475	784	0.058	860	104
F	69		697		419	73
M	58		649		861	107
M	68	12688	744	0.059	563	80
M	79	16295	801	0.049	698	102
F	58		553		607	86
F	64		616		539	70
M	70	6244	324	0.052	435	66
M	74		693		430	67
F	73		682		840	138
F	68		570		694	97
F	58		552		1840	275
F	72	8853	740	0.084	438	71
M	54	10677	789	0.074	354	66
M		5936	583	0.098	332	54
F	54		459		888	100
F	76	11437	758	0.066	439	70
F	65		581		1236	144

Tableau 9 : Données démographiques, cliniques et biologiques des patients donneurs de LCS post-mortem. SLA = Sclérose latéral amyotrophique. MGA = Maladie à grains argyrophiles. IV = Intraventriculaire. N=7

Sexe	Age du décès	Délai post-mortem (h)	Diagnostic	Braak	Thal	Prélèvement
F	59	40	DCB			IV
M	77	35	DCB/SLA			IV
F	67	27	MA	VI	5	IV
F	79	16	MA	VI	5	IV
F	79	16	MA	VI	5	PL
M	80	38	MGA			PL
F	65	15	DFT			PL

Tableau 11 : Données démographiques et cliniques des patients MA donneurs de plasma. N=28

Diagnostic	Sexe	Âge	Score MMSE /30
MA	F	60	0
MA	F	60	4
MA	F	61	0
MA	F	62	21
MA	F	60	1
MA	F	57	21
MA	F	63	21
MA	F	62	0
MA	M	56	19
MA	F	53	1
MA	M	66	1
MA	M	66	22
MA	M	61	3
MA	M	58	22
MA	M	59	23
MA	F	64	4
MA	M	62	0
MA	F	64	0
MA	M	56	1
MA	F	58	21
MA	F	68	0
MA	M	60	2
MA	F	62	1
MA	F	58	1
MA	M	55	27
MA	M	66	15
MA	M	84	24
MA	F	59	17

Tableau 10 : Données démographiques et cliniques des patients non MA donneurs de plasma. N=13

Diagnostic	Sexe	Âge
Maladie de Steinert	M	36
NA	F	17
NA	M	16
Épendymome	F	38
Adénome hypophysaire	F	50
Diabète	M	14
Diabète	M	15
Dépression	F	41
Neurofibromatose	F	41
Mélanome	F	64
NA	F	49
NA	M	76
Sclérose tubéreuse de Bourneville	F	28

Publication 1 : *Extracellular vesicles: major actors of heterogeneity in tau spreading among human tauopathies*

Accepté dans *Molecular Therapy* (IF : 11,45)

Extracellular vesicles: major actors of heterogeneity in tau spreading among human tauopathies

Elodie Leroux^{1†}, Romain Perbet^{1†}, Raphaëlle Caillerez¹, Kevin Richetin^{2,3,4}, Sarah Lieger¹, Jeanne Espourteille², Thomas Bouillet¹, Séverine Bégard¹, Clément Danis¹, Anne Loyens¹, Nicolas Toni², Nicole Déglon^{3,4}, Vincent Deramecourt¹, Susanna Schraen-Maschke¹, Luc Buée^{1*} and Morvane Colin^{1*}

Short title: EVs in pathological tau propagation

1. Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience & Cognition, F-59000 Lille, France.

2. Department of Psychiatry, Center for Psychiatric Neurosciences, Lausanne University Hospital (CHUV) and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

3. Lausanne University Hospital (CHUV) and University of Lausanne, Neuroscience Research Center (CRN), Laboratory of Neurotherapies and Neuromodulation, 1011 – Lausanne, Switzerland

4. Lausanne University Hospital (CHUV) and University of Lausanne, Department of Clinical Neuroscience (DNC), Laboratory of Neurotherapies and Neuromodulation, 1011 – Lausanne, Switzerland

†. Equal contributors

* Corresponding authors:

Drs M. Colin & L. Buée

Lille Neuroscience & Cognition, Inserm UMR-S 1172, ‘Alzheimer & tauopathies’

Univ. Lille, Fac. de Médecine – pole recherche

Bâtiment Biserte, rue Polonovski

59045 Lille Cedex, France

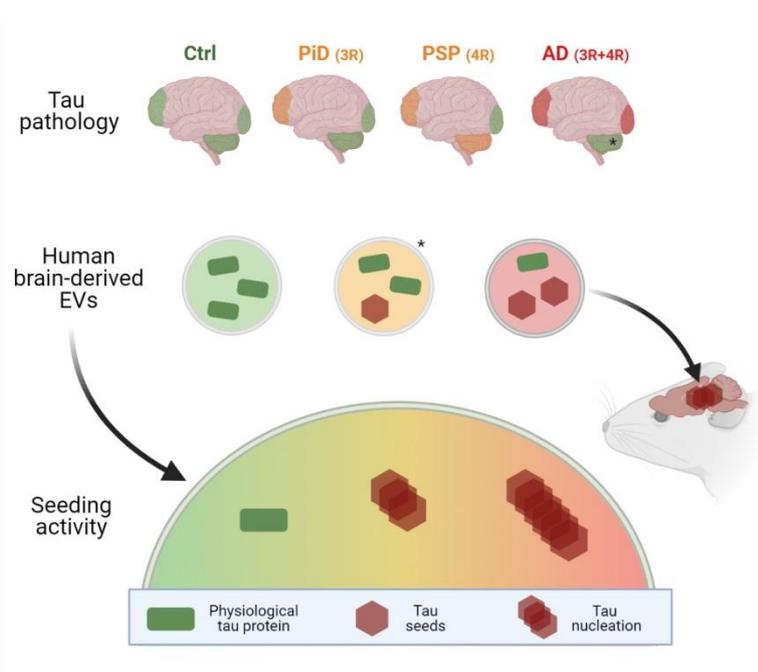
Tel: 33-3-20 62 20 73, Fax: 33-2-20 53 85 62

M.C. (morvane.colin@inserm.fr, ORCID 0000-0003-0611-4167) and L.B. (luc.buee@inserm.fr, ORCID 0000-0002-6261-4230)

Abstract

Tauopathies are neurodegenerative diseases characterized by tau inclusions in brain cells. Seed-competent tau species have been suggested to spread from cell to cell in a stereotypical manner, indicating that this may involve a prion-like mechanism. Although the intercellular mechanisms of transfer are unclear, extracellular vesicles (EVs) could be potential shuttles. We assessed this in humans by preparing EVs from brain-derived fluids. These latter were isolated from different brain regions in various tauopathies and their seeding potential was assessed *in vitro* and *in vivo*. We observed considerable heterogeneity among tauopathies and brain regions. The most striking evidence was coming mainly from Alzheimer's disease where the EVs clearly contain pathological species that can induce tau lesions *in vivo*. The results support the hypothesis that EVs participate in the prion-like propagation of tau pathology among tauopathies, and there may be implications for diagnostic and therapeutic strategies.

Graphical abstract



Key words: biological fluids, exosomes, microvesicles, prion-like propagation, tauopathies, Alzheimer's disease

Introduction

Tau, a microtubule-associated protein,¹ aggregates into filaments in Alzheimer's disease (AD) and in other related and heterogeneous diseases called tauopathies, which are characterized by the intracellular accumulation of hyperphosphorylated tau.² An alternative splicing mechanism gives rise to six major isoforms of tau that coexist in the human brain, which either have three or four repeated sequences of the microtubule-binding region (3R-tau and 4R-tau).³ In AD, tau protein principally aggregates into paired helical filaments (3R-tau and 4R-tau) within the neurons, while in progressive supranuclear palsy (PSP), tau aggregates consist of straight filaments (4R-tau) and are found in both the neurons and the glia. In Pick's disease (PiD), specific neuronal tau inclusions are seen, known as Pick bodies, in which 3R-tau aggregates form a spherical shape within the neuronal cell body. These different tauopathy filaments are beginning to be better described and are different among tauopathies.⁴⁻⁷

In AD, the most common tauopathy, the progression of neurodegeneration in the brain correlates very well with the clinical signs of the disease at each stage. It follows a sequential, hierarchical progression of brain involvement in a pattern that is similar for all patients: the hippocampal formation, the polymodal association areas, the unimodal association regions, and in the final stages of the disease, the entire cerebral cortex.^{8,9} This stereotypical hierarchy of neurodegeneration is known in the literature as the Braak stages.⁸ Specific hierarchical pathways have also been described for PSP,^{10,11} argyrophilic grain disease,¹² and PiD.¹³ These patterns of progression have been considered as steps in the propagation of neurodegeneration and have led to the hypothesis of a prion-like tau propagation.³ In this hypothesis, an abnormal tau protein conformation would lead to the prion-like transconformation of normal tau proteins into abnormal ones. This would be followed by the secretion of pathological seeds, which would then be internalized by healthy neurons thus transmitting the pathology.

While tau was first identified as a protein implicated in the assembly and stabilization of microtubules,¹ it is now described as a pleiotropic protein with various cellular locations.¹⁴ It is known that the protein can be secreted by unconventional pathways, mostly in a free form,¹⁵⁻²⁵ and it has also been found in extracellular vesicles (EVs).²⁶ EVs have two main cellular origins: (1) EVs known as exosomes are generated from multivesicular bodies, containing intraluminal vesicles, that are secreted into the extracellular fluid, and (2) EVs known as ectosomes originate from direct plasma membrane budding.²⁷ These vesicles have the capacity to transfer many biologically active molecules between cells, and they are known to be dysregulated in many disorders.²⁸ While the secretion of tau in EVs has been validated using many cell and animal models,²⁹ there is little data concerning the transfer of pathological tau species or seeds between cells,³⁰ to induce a seeding process in humans.³¹ According to the hypothesis of prion-like propagation, once inside the recipient cell, the seeds present in EVs

seem to be released from the endolysosome and lead to the recruitment and misfolding of normal endogenous proteins.³²

While tau aggregation is a common feature of tauopathies, a huge heterogeneity exists between and within these pathologies. Recent data suggest, for instance, that pathological tau seeds in human brains differ between tauopathies,³³ and also within a particular tauopathy, as has been shown for AD.³⁴ Additionally, the affected brain pathways differ between AD and other tauopathies, and some cell populations are more vulnerable than others.^{8, 11-13} It is thus essential to understand the underlying reasons for this heterogeneity before designing a specific therapeutic approach.

In this work, we focused our attention on EVs because they have a certain selectivity in terms of the target cell due to the presence of numerous ligands and receptors on their surface.²⁷ They therefore represent a unique intercellular delivery vehicle for transferring pathological species from one specific neuronal population to another, and they could explain the differing cell vulnerability seen in tauopathies. The work presented here aims to compare the transmission of tau pathology via EVs that are present within brain-derived-fluids (BD-fluids) of patients with various tauopathies. Although EVs isolated from the cerebrospinal fluid,³⁵⁻³⁷ and plasma,³⁸⁻⁴³ contain tau, the interstitial fluid (ISF) more accurately represents the environment around brain cells. This work therefore focuses on brain-derived-EVs (BD-EVs) in different tauopathies (AD, PSP, and certain forms of non-hereditary frontotemporal lobar degeneration with Pick bodies [formerly known as PiD]) as well as non-demented controls. The seeding ability from BD-EVs purified from both tau transgenic mice and patients with various tauopathies is shown *in vitro*. In addition, AD BD-fluid-derived EVs are able to transmit tau pathology *in vivo* in a prion-like process. These results highlight the importance of defining how the pathology propagates through the brain in different tauopathies in order to design specific and tailored therapies as well as assessment tools for the evaluation of clinical trials.

Results

In the present work, we isolated EVs from the post-mortem BD-fluid of patients with various tauopathies, and we evaluated whether they contain species that are able to seed and spread the tau pathology in the brain.

EVs are present in the BD-fluid of a transgenic mouse model of tauopathy- To address this issue, we first isolated and characterized murine BD-EVs from a transgenic mouse model of tauopathy, the THY-tau30, that expresses human 1N4R tau protein with two pathogenic mutations (P301S and G272V) under the control of the neuron-specific Thy-1.2 promoter.^{44, 45} We prepared murine BD-fluids according to the protocol described by Polanco and collaborators.⁴⁶ We then purified and characterized EVs from the murine BD-fluid using size-exclusion chromatography (SEC). As it is critical to remove any aggregated or macro-protein contaminants associated with the EVs, we purified EVs using SEC rather than classical ultracentrifugation procedures.⁴⁷ The concentration and distribution of the EVs were analyzed by a nanoparticle tracking analysis (NTA) system, the global protein content and its distribution were determined using UV detection or silver gel staining. SEC allowed us to efficiently enrich EVs (fractions one to four [F1-4]) in our preparations from the protein contaminants, as previously described, while guaranteeing the morphological integrity of the vesicles (Figure 1C). A size distribution of the EV fractions revealed the presence of vesicles ranging from 50 nm to 400 nm (Figure 1D). Then, we used MALDI-TOF LC-MS/MS and quantitative analysis (IBAQ) to evaluate F1-4 proteomic content. We identified a total of 2064 proteins, of which 1635 (79%) are referenced in the VesiclePedia's database. Intensity-based absolute quantification (IBAQ scores) combined with Gene Ontology Cellular Components (GOCC) annotation revealed that GOCC terms associated with EVs represent 76% of total IBAQ scores for the 20 selected terms (Figure 1E). Among proteins recommended by the MISEV2018,⁴⁸ we identified a majority of categories 1a (non-tissue specific transmembrane or GPI-anchored proteins), 2a (cytosolic proteins recovered in EVs) and 4a (transmembrane, lipid-bound and soluble proteins associated to other intracellular compartments than plasma membrane/endosomes) (Figure 1F). Among them are found the cytosolic vesicular markers, HSP90 and tau protein (MAPT), which have been validated using either western-blot (Figure S1A) or ELISA assays (Figure 1G). In addition, using a proteinase K (PK) digestion assay, we showed that tau is found inside EVs and not associated to their outer leaflet. Indeed, the extravesicular proteolysis (PK+, RIPA-) does not affect intravesicular tau concentration and thus confirming tau as an intravesicular component (Figure 1G). This full characterization including NTA, silver gel staining, electron microscopy, proteomics and western-blot indicates that F1-4 are enriched in EVs. This pool was considered as the EVs fraction in the following experiments.

BD-EVs from a transgenic mouse model of tauopathy contain tau seeds- In order to determine the role of EVs in tau pathology spreading, the tau seeding content of BD-EVs prepared from 1-, 3- and 6-month-old THY-tau30 mice (a transgenic mouse model with progressive tau lesions) was evaluated.⁴⁴ As controls, we also isolated BD-EVs from wild-type littermates and transgenic APP/PS1 mice (that develop amyloid deposition) that do not exhibit tau aggregation.⁴⁹ Tau lesions were examined in the brains of these animals using two well characterized anti-tau antibodies: MC1⁵⁰ (tau conformational dependent antibody) and AT100,⁵¹ (human phospho-dependent antibody that allowed the detection of insoluble/aggregated tau. MC1 (Figure S2a-g) and AT100 (Figure S2h-n) immunoreactivities were progressively detected in the hippocampal neurons of the CA1 layer of THY-tau30 mice from 1 to 6 months. Whereas few to no MC1 (Figure S2e) and AT-100 (Figure S2l) immunoreactivities were seen at 1-month-old respectively, MC1 immuno-positive neurites were easily detectable at 3 months with a few positive cell bodies (Figure S2f). A very slight AT100-immunostaining was also seen in 3-month-old mice in the subiculum (Figure S2m) when a strong immunoreactivity (in soma and neurites) was shown in 6-month-old animals by both MC1 and AT100 antibodies (Figure S2g and n respectively). No AT100- and MC1-immunoreactivities were observed in the wild-type littermates (Figure S2b-d, i-k) or in the transgenic APP/PS1 controls (Figure S2a, h). We then isolated BD-EVs of these murine BD-fluid and evaluated their ability to induce a nucleation process using a biosensor assay.⁵² This involved a highly sensitive and quantitative assay using a novel Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)-based biosensor cell line that specifically reports tau seeding activity. These cells express soluble forms of RD-P301Stau-CFP and RD-P301Stau-YFP. In presence of seeds such as recombinant tau fibers, an oligomerization process allows energy transfer between CFP and YFP that is detectable by flow cytometry. EVs were introduced inside the biosensor cells using lipofectamine and the seeding activity was quantified. BD-EVs of THY-tau30, unlike those obtained from the control lines (littermate of THY-tau30 and APP/PS1), contained seed-competent species (Figure 2A). In fact, the FRET signal was observed in an age-dependent manner only with THY-tau30 samples. The seeding effect was indeed related to EVs since their removal by ultracentrifugation in F1-4 abolished the FRET signal (compare ultracentrifugation supernatant (no EVs) to pellet (EVs fraction)) (Figure 2B). In addition, tau was mainly found within vesicles as demonstrated by tau immunodepletion after EVs sonication (Figure 2C). Indeed, when intravesicular tau was immunodepleted, a 70% decrease in the FRET signal was observed (Figure 2D).

Together, these data strongly support the hypothesis that the progressive appearance of tau pathology in mice leads to the release of EVs in the BD-fluid that contain seed-competent tau species.

The seeding capacity of BD-EVs is heterogeneous among human tauopathies- We showed that the presence of tau seeds inside BD-EVs is related to the progression of tau pathology in the case of mice.

Given the heterogeneity among tauopathies, we questioned whether the seeding potential of BD-EVs would differ between these neurodegenerative diseases. Post-mortem brain samples of human non-demented controls (n = 5), AD (n = 10), PSP (n = 10), and PiD (n = 5) patients were obtained (Table 1) in order to isolate BD-EVs, as described above (Figure 1). Three brain regions (the prefrontal cortex, the occipital cortex, and the cerebellum) differentially affected by the pathology were dissected, and tau lesions were quantified by immunohistochemistry (IHC) using AT8, a phospho-dependent anti-tau antibody (Figures 3A and 3B). As expected, tau pathology is higher in AD cases. After SEC purification, the BD-EVs shared the same characteristics (size, morphology, content) as those isolated from the murine brain (Figure S3). Additionally, the presence of a specific transmembrane tetraspanins associated with the EVs was validated using immunogold electron microscopy (CD63; Figure S1B).

In contrast to the mice, where the whole brain was analyzed, only specific areas of the human brain were dissected for BD-fluid isolation. To avoid any bias, the results were systematically normalized according to the weight of the brain extracts used to prepare the BD-fluid. Our data showed that the EV concentration (Figure 4A) and the global tau content (Figure 4B) did not differ among the tauopathies. Interestingly, BD-EVs from the brains of the controls contained global tau at a similar level than from patients with tauopathies. This confirms that tau is physiologically secreted in EVs and gives new insight into the mode of tau secretion in human brain. In contrast to the mice, where the whole brain was analysed, only specific areas of the human brains (frontal and occipital cortices, cerebellum) were dissected for BD-fluid isolation.

To determine whether the tau protein present in BD-EVs can induce a nucleation process and whether this is similar among tauopathies, EVs were applied to biosensor cells, as before. The EV contents from the prefrontal and occipital regions of the AD BD-fluid induced a significant FRET signal compared to the non-demented controls. For BD-EVs from the PSP and PiD patients, a weak FRET signal was observed (Figure 4C), which was consistent with neuropathology (Figure 3). It is relevant to note that among the PiD samples, one had BD-EVs displaying a high FRET signal. This patient exhibited, in addition to Pick bodies, neurofibrillary tangles (NFT) as seen in AD patients (Table 1), which could potentially account for this finding. Whereas the FRET signal is related to the tau lesions in most cases (compare Figures 3B and 4C), as shown for the mice, the FRET signal for the AD cerebellum was significantly higher than in the controls, even though both were devoid of tau lesions. This FRET signal did not reflect a passive release of intracellular EVs due to cell death, as there was no correlation between the post-mortem delay and the FRET signal (Figure 4D). Together, our results demonstrate that although the global level of tau is similar in BD-EVs, the seeding/nucleation competency is clearly different according to the tauopathy considered, with a particularly high activity found in AD, in accordance with previous studies.³¹

BD-EVs are able to transmit tau pathology *in vivo*- To validate the seeding capacity of BD-EVs and to determine whether these EVs are able to transmit tau pathology *in vivo*, we adapted our *in vivo* model of seeding.⁵³ This model is based on the intracerebral injection of material derived from AD brains into the hippocampi of 1-month-old THY-tau30 mice. At this age, the endogenous tau pathology is very weak,⁴⁴ thus allowing us to evaluate the seeding activity associated with the injected, human-derived material.

Four prefrontal cortex BD-fluid samples were pooled for each group: AD, PSP, PiD, and control. The BD-EVs were tested using the FRET assay (Figure 5A) before being injected into the animals (6×10^9 vesicles per hippocampus). A lower signal was generated for the PSP and PiD groups compared to the AD group, thus confirming what was previously shown *in vitro* (Figure 4C). These intact BD-EVs were then bilaterally injected in THY-tau30 mice and control littermates. Their respective ability to seed endogenous tau was monitored by IHC using MC1 (tau conformational dependent antibody) or AT100 (human phospho-dependent antibody that allowed the detection of insoluble/aggregated tau) (Figure 5B). When the BD-EVs were injected into the wild-type mice, no MC1 or AT100 immunoreactivity was observed. No seeding occurred and the tau species contained within the EVs were not detected. In contrast, tau seeding was seen when BD-EVs from AD patients were injected in the THY-tau30 mice. MC1- and AT100- immunoreactivities were quantified. In contrast, injected BD-EVs from PSP and PiD did not induce any higher MC1- or AT100-immunoreactivity than BD-EVs purified from human control brains (Figure 5C and D respectively). This lower seeding capacity of BD-EVs from PSP and PiD than those from AD confirmed our *in vitro* data (Figure 4).

Altogether, our data show that EVs containing tau seeds are then capable to mediate the misfolding and phosphorylation of tau. It then strongly suggests the ability of the EVs content to recruit and convert endogenous tau into an abnormal conformational form differs among tauopathies, consistently with neuropathology, thus suggesting the existence of specific species inside the BD-EVs according to the particular tauopathy.

Discussion

In this study, we investigated the role of BD-EVs in the heterogeneity and cell vulnerability of tauopathies. EVs possess ligands and/or receptors that are compatible with a specific cell type, this could explain the neuronal selectivity and the hierarchy of neurodegeneration within tauopathies. To date, most studies have investigated the role of EVs in cell or animal models,^{26, 32, 46, 55, 56} but little data is available for humans, especially when considering the ISF that is in direct contact with the brain cells and which is likely to be part of the prion-like process. The presence of EVs capable of transferring material between cells (Figures 5 and S4)^{31, 54} can help to explain the progression of the pathology in tauopathies. A very recent and elegant study carried out by Ruan and collaborators showed for the first time that AD brain-derived EVs spread tau pathology with defined interneurons as their target.³¹ Here, we go further into this mechanism by determining the contribution of EVs to the heterogeneity of tauopathies by isolating and comparing BD-EVs from AD, PSP, and PiD, and from various brain regions differentially affected by the tau pathology.

Using our mouse models, we were able to (1) control the quality of BD-EVs preparations, (2) demonstrate the role of BD-EVs-tau in the seeding process, and most importantly, (3) highlight a link between EV seeding capacity and the severity of the tau pathology. We confirmed these results in humans using brain regions that are differentially affected by the pathology (the prefrontal cortex, the occipital cortex, and the cerebellum), and the EVs seeding capacity was particularly striking in the case of AD. Specifically, BD-EVs from AD patients clearly contained seed-competent tau species (shown in the FRET assay), whereas such tau species were lower in the PSP and PiD materials. In general, tau pathology is much weaker in PSP and PiD than in AD, and this may participate to the low seeding capacity of EVs in these pathologies. However, other explanations are also possible: (1) although not unanimous, the prion-like propagation hypothesis may not be appropriate for PSP and PiD,³ (2) a prion-like propagation may also exist for PSP and PiD, but EVs may not be the preferred shuttle, contrary to AD, and (3) the FRET assay to measure seeding in PSP and PiD was less effective than in AD. In line with this latter possibility, previous studies found that PSP materials gave heterogeneous FRET signals.^{33, 57} Although a FRET signal was previously reported in PiD,³³ we did not observe a strong signal for most of the PiD cases in the present work. In fact, the only PiD patient showing a FRET signal also displayed NFT, and this was the oldest PiD patient. We previously published that PiD patients displaying Pick bodies with additional NFT have aging/AD-like materials, namely a pathological tau triplet revealed by immunoblotting.^{58, 59} The presence of such AD-like materials in this PiD patient could explain the high FRET signal as observed in the AD group.

Overall, our results suggest that the species shuttled by EVs are very heterogeneous among tauopathies. What do we know about tauopathies? In PiD, there is an accumulation of tau3R in Pick's bodies, and it is currently classified as frontotemporal lobar degeneration (FTLD)-tau.⁶⁰ Nevertheless,

it is difficult to differentiate PiD and FTLD-tau with MAPT mutations (former FTDP-17). Both disorders have Pick bodies, but it has been shown that the Pick bodies are pS262-negative in PiD,^{61, 62} and immunoreactive in FTLD-tau with MAPT mutations.^{63, 64} In any case, this lesion would appear to be particularly harmful because PiD often affects people who are relatively young (around 50 years of age), and it is characterized by very severe frontotemporal atrophy that is associated with neuronal death. Pick bodies are mostly found in layers II and VI of the fronto-temporal isocortex and in the granular cell layer of the dentate gyrus.^{59, 65} These cells mainly express 3R-tau isoforms. It can therefore be postulated that these 3R-positive cells are fragile,⁶⁶ or else that the 3R-tau isoforms are more harmful than propagative.⁶⁷⁻⁶⁹ In PSP, tau4R isoforms mostly aggregate to cause neurofibrillary degeneration. It is possible that the 4R-tau variants are secreted and captured by the glia. In line with this, both PSP and corticobasal degeneration are also characterized by gliofibrillary lesions.^{60, 70, 71} Finally, in AD, all six tau isoforms aggregate, and neurofibrillary degeneration progresses in a hierarchical pathway from limbic, polymodal association, unimodal association regions to the entire cerebral cortex. These observations suggest that tau seeds circulate in the ISF of AD brains. Our data support this hypothesis since tau seeds were identified in circulating EVs in all brain areas studied, even those devoid of tau lesions, such as the cerebellum. Depending on the brain area, EVs receptor/ligand bearing cells may or may not be present, which explains why some regions are affected by pathology while others are not. The combination of tau seeds in EVs and their ligand/receptor composition may therefore explain the neuronal selectivity/vulnerability and hierarchical pathway of neurodegeneration among tauopathies.

The molecular species involved in the pathological cycle of cell-to-cell transmission remain unknown, even though a great deal of work has been done to examine the roles of phosphorylation, truncation, oligomers, high molecular weight species, etc.²⁹ Nevertheless, our work highlights the diversity of tau species inside EVs among tauopathies, and reinforces the hypothesis of prion-like propagation. It supports a trans-cellular transmission mechanism with a specificity that could explain the hierarchical and stereotypical propagation compatible with the Braak stages in AD.

Together, our data strongly support the existence of various tau species or co-factors inside BD-EVs among tauopathies, and their identification is now necessary in order to be able to determine the mechanism of tau pathology progression in these different diseases. The study raises a number of questions about therapeutic strategies, such as immunotherapy, that target free extracellular tau. Deciphering the nature of the pathological seeds found in the EVs isolated from human brains, as well as the characteristics of the cargos/shuttles, will help in the design of specific tools aiming to block tau spreading.

Materials and methods

Antibodies- The following antibodies were used for IHC, biochemical assays, and electron microscopy at the dilutions indicated below. Monoclonal antibody (mAb) AT8 recognizes the phosphoserine 202, phosphoserine 208, and phosphothreonine 205 residues of tau (MN1020; Thermo Scientific, Illkirch, France; 1/500 for IHC).⁷² The mAb MC1 (a generous gift from Dr. Peter Davis; 1/1000 for IHC) recognizes conformational changes, and its reactivity depends on both the N terminus (amino acids 7–9) and an amino acid sequence of tau (amino acids 313–322) in the third microtubule binding domain.^{50, 73} The mAb AT100 (MN1060; Thermo Scientific, Illkirch, France; 1/500 for IHC) recognizes phosphothreonine 212 and phosphoserine 214 and allowed the detection of insoluble/aggregated tau.^{51, 74-76} The mAb HT7 (MN100; Thermo Scientific, Illkirch, France; used in the INNOTEST® hTAU, as recommended by the manufacturer, Fujirebio) recognizes human tau (amino acids 159-163). Anti-HSP 90 α/β (F-8; sc-13119; 1/100 for western blotting). Anti-CD63 is a mouse mAb (Novusbio H5C6; nbp2-42225; 1/50 for electron microscopy), Anti-NeuN is a rabbit mAb (Chemicon MAB377; 1:1000), and anti-V5 is a mouse mAb (Millipore AB3792; 1:500).

Animals and human samples- The study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. The experimental research was performed with the approval of an ethics committee (agreement APAFIS#2264-2015101320441671 from CEEA75, Lille, France) and follows European guidelines for the use of animals. The animals (males and females) were housed in a temperature-controlled room (20-22°C) and maintained on a 12 h day/night cycle with food and water provided ad libitum in a specific, pathogen-free animal facility (with 5 mice per cage or 4 rats per cage). Animals were randomly allocated to the different experimental groups. THY-tau30 mice were used that express human 1N4R tau protein with two pathogenic mutations (P301S and G272V) under the control of the neuron-specific Thy-1.2 promoter.^{44, 45}

Non-demented human control (n=5), AD (n=10), PSP (n=10), and PiD (n=5) brain extracts were obtained from the Lille Neurobank (fulfilling French legal requirements concerning biological resources and declared to the competent authority under the number DC-2008-642) with donor consent, data protection, and ethics committee approval. Samples were managed by the CRB/CIC1403 Biobank, BB-0033-00030. The demographic data are listed in table 1.

Cell culture- The TauRDP301SFRET Biosensor cells (ATCC CRL-3275), HEK293T cells, and HeLa cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum, 1% GlutaMAX, and without HEPES. The cells were maintained in a humidified incubator with 5% CO₂. All cell lines were passaged twice a week. Rat primary cortical neurons were prepared from 17-day-old Wistar rat embryos, as previously described.⁷⁷ Ten days later, cells were infected with lentiviral vectors (LV) encoding human 1N4R wild-type Tau, as previously described.⁷⁸

Brain-derived fluid isolation- BD-fluids were isolated, as previously described.⁴⁶ For the frozen human brains, specific regions were removed (prefrontal cortex, occipital cortex, and cerebellum). 85 samples were used with a mean of 1.5 g \pm 0.07 of tissue. Some brain areas were no more available: cerebellum (1AD, 1 PiD and 2 PSP), cortex prefrontal (1 PSP). To avoid any bias in our results, normalization according to the weight of the brain extracts have been systematically done.

For the mice, immediately after death, the whole brain (without the olfactory bulb and cerebellum) was recovered and frozen. The tissues were incubated on ice in 5 ml of Hibernate-A (50 mM NaF, 200 nM Na₃VO₄, 10 nM protease inhibitor [E64 from Sigma and Protease Inhibitor Cocktail from Roche]). The tissues were gently mixed in a Potter homogenizer and 2 ml of 20 units/ml papain (LS003119, Worthington) in Hibernate-A were added to the homogenate for 20 min at 37°C with agitation. 15 ml of cold Hibernate-A buffer was then added and mixed by pipetting to stop the enzymatic activity. Successive centrifugations were applied at 4°C (300, 2000, and 10 000 g) to remove cells, membranes, and debris, respectively. The final supernatant was kept at -80°C before the EV isolation procedures were applied.

EV isolation- The procedures to isolate the EVs from the murine or human BD-fluid were carried out in accordance with the MISEV guidelines that were established and updated in 2018 by the International Society for Extracellular Vesicles.⁴⁸ We applied various controls to validate the enrichment and the content of the EVs, as recommended in these guidelines. 500 μ l of BD-fluid were loaded on the top of a SEC column (10 ml column, CL2B sepharose, pore size 75 nm, Millipore)⁷⁹. It allowed us to recover a mean of 7.94 \times 10¹⁰ vesicles/g of tissue \pm 3.36 \times 10⁹ in F1-F4 fractions (n=85 samples). Isolation was carried out in phosphate buffered saline (PBS) with a flow of 36-48 sec/ml. The first 3 ml were eliminated and the following 20 fractions were recovered (with 500 μ l per fraction). NTAs were performed on individual fractions diluted in PBS with a Nanosight NS300 (Malvern Panatycal). To generate statistical data, five videos of 90 seconds were recorded and analyzed using NTA software (camera level: 15; detection threshold: 4). When indicated a further ultracentrifugation (100000g, 50 min at 4°C, TLA110 rotor) was done.

Electron microscopy- Fractions one to four from the SEC were pooled and concentrated to a final volume of 50 μ l using Amicon® Ultra 3K (Merck Millipore). Samples (5 μ l) were deposited on a carbon film supported grid (400 mesh) and incubated at room temperature (RT) for 20 min. For immunogold labelling, fixation in 2% paraformaldehyde (PFA; PO₄ buffer 0.1 M, pH 7.4) was performed for 20 min. Grids were rinsed for 2-3 min in PBS-Glycine (50 mM) at RT. They were then soaked in a mixture containing 1% PBS-Bovine serum albumin (BSA) and 1% normal goat serum for 1h at RT before incubation with the primary Ab (1/50) in a mixture of 1% PBS-BSA and 1% normal goat serum, followed by rinsing in 0.1% PBS-BSA. Grids were then incubated for 1h at RT with the appropriate goat anti-mouse secondary Ab (1/20, 12 nm colloidal gold) and finally washed in PBS. For immunogold labelling and morphological analyses, the grids were fixed in PBS-Glutaraldehyde (1%) for 5 min at RT and then rinsed in distilled water. They were incubated for 5 min in 1% uranyl acetate and for 10 min on ice in a mixture containing 1% uranyl acetate/2% methylcellulose. Dry grids were observed under a transmission electron microscope (Zeiss EM900).

MALDI-TOF LC-MS/MS analysis- Protein Digestion- F1-4 fractions were digested according to a modified version of the iST method⁸⁰ (named miST method). Briefly, 50 μ l solution in PBS were supplemented with in 50 μ l miST lysis buffer (1% Sodium deoxycholate, 100 mM Tris pH 8.6, 10 mM DTT) and heated at 95°C for 5 min. Samples were then diluted 1:1 (v:v) with water and reduced disulfides were alkylated by adding ¼ vol of 160 mM chloroacetamide (final 32 mM) and incubating at 25°C for 45 min in the dark. Samples were adjusted to 3 mM EDTA and digested with 0.5 μ g Trypsin/LysC mix (Promega #V5073) for 1h at 37°C, followed by a second 1h digestion with a second and identical aliquot of proteases. To remove sodium deoxycholate and desalt peptides, two sample volumes of isopropanol containing 1% TFA were added to the digests, and the samples were desalted on a strong cation exchange (SCX) plate (Oasis MCX; Waters Corp., Milford, MA) by centrifugation. After washing with isopropanol/1%TFA, peptides were eluted in 250 μ l of 80% MeCN, 19% water, 1% (v/v) ammonia; Liquid Chromatography-tandem Mass spectrometry- Eluates after SCX desalting were frozen, dried, and resuspended in variable volumes of 0.05% trifluoroacetic acid, 2% acetonitrile to equilibrate concentrations. Approximately 1 μ g of each sample was injected on column for nanoLC-MS analysis; MS analysis- Data-dependent LC-MS/MS analysis of TMT sample was carried out on a Fusion Tribrid Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) interfaced through a nano-electrospray ion source to an Ultimate 3000 RSLCnano HPLC system (Dionex). Peptides were separated on a reversed-phase custom packed 40 cm C18 column (75 μ m ID, 100Å, Reprosil Pur 1.9 μ m particles, Dr. Maisch, Germany) with a 4-76% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid (total time 140 min). Full MS survey scans were performed at 120'000 resolution. A data-dependent acquisition

method controlled by Xcalibur 4.2 software (Thermo Fisher Scientific) was used that optimized the number of precursors selected (“top speed”) of charge 2+ to 5+ while maintaining a fixed scan cycle of 1.5s. The precursor isolation window used was 0.7 Th. Full survey scans were performed at a 120’000 resolution, and a top speed precursor selection strategy was applied to maximize acquisition of peptide tandem MS spectra with a maximum cycle time of 0.6s. HCD fragmentation mode was used at a normalized collision energy of 32%, with a precursor isolation window of 1.6 m/z, and MS/MS spectra were acquired in the ion trap. Peptides selected for MS/MS were excluded from further fragmentation during 60s; MS Data analysis- Tandem MS data were processed by the MaxQuant software (version 1.6.3.4)⁸¹ incorporating the Andromeda search engine⁸². The UniProt reference proteome (RefProt) databases for Homo sapiens and mouse were used, supplemented with sequences of common contaminants. Trypsin (cleavage at K, R) was used as the enzyme definition, allowing 2 missed cleavages. Carbamidomethylation of cysteine was specified as a fixed modification. N-terminal acetylation of protein and oxidation of methionine were specified as variable modifications. All identifications were filtered at 1% FDR at both the peptide and protein levels with default MaxQuant parameters⁸³. MaxQuant data were further processed with Perseus software⁸⁴, R statistical software and Microsoft Excel. We considered proteins as present in sample when unique + Razor Peptide Score >2 and an MS/MS Count >2. IBAQ values were calculated based on the summed intensities of all unique peptides for a protein divided by the number of theoretical tryptic peptides between 6 and 30 amino acids in length⁸⁵.

Western blotting & silver gel staining- Western blotting was performed, as previously described.⁸⁶ Briefly, boiled samples (10 min, 100°C) were loaded onto a 4-12% Bis-Tris NuPAGE® Novex® gel (Invitrogen), followed by transfer onto a 0.45 µm membrane, using the Novex system from Life Technologies (XCell II™ blot module). The membrane was then incubated with blocking solution for 1h at RT before incubation with the appropriate primary Ab overnight at 4°C. The membrane was then incubated for 1h with the appropriate secondary Ab (HRP conjugated Ab, 1/50 000). The signal was visualized using enhanced chemiluminescence western blotting detection reagents (GE Healthcare). For silver gel staining, the same procedure was followed without the transfer onto a membrane. The gel was fixed overnight after migration in a mixture containing 40% ethanol and 10% acetic acid. Proteins were revealed by silver staining using the PlusOne silver staining kit and following the manufacturer’s procedures (GE Healthcare).

Tau immunodepletion- EVs fractions were isolated from the BD-fluid of 3-months-old THY-tau30. Immunodepletion of tau from fractions 1-4 was performed using Magna CHIP Protein A+G magnetic beads (#16-663, Sigma-Aldrich). After 30 min in water bath sonicator, fractions 1-4 were incubated

overnight with 2 µg of anti-tau Ab (HT7, #MN1000, Thermo Scientific) or control mouse monoclonal IgG1 antibody (GST [B-14], Santa Cruz) with rotation at 4°C. 20 µL of magnetic beads was incubated with the complex antibody-antigen for 2 hours with rotation at 4°C. Magnetic beads-antibody-antigen complex was isolated using a magnetic holder and the supernatant was collected.

PK treatment- PK assay was done as previously described.^{31, 54} EVs (lysis or not with RIPA buffer) were incubated with 10 µg/mL of PK 30 min at 37°C to remove extravesicular proteins. The PK activity was then inhibited by adding 5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) for 10 min at room temperature.

Recombinant K18 fibrils- The tau K18 recombinant protein and heparin were mixed to a ratio of 4:1 in aggregation buffer (Hepes 10 mM, pH 6.9; NaCl 1000 mM) with a final protein concentration of 8 µM and incubated for 36 to 48 hours at 37°C without shaking. The aggregation was confirmed at the end of the experiment by adding 50 µM of Thioflavin T to a 100 µl aliquot and comparing this to a negative control without the addition of heparin. The thioflavin T emission was detected at 490 nm after excitation at 440 nm using a PHERAstar (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany).

FRET assay-⁵² Cells were plated into a 12-wells plate (150 000 cells per well) 24 hours before treatment. Sonicated K18 fibrils (2 µM) were used as a positive control and PBS was the negative control. EV fractions were pooled (F1-F4) and concentrated in Amicon-3K columns to generate a final volume of 50 µl. The transfection mixture (50 µl EVs + 50 µl optiMEM plus 10 µl of lipofectamine-2000 + 90 µl optiMEM) was incubated for 20 min at RT and added to the cells. After 72 hours, the cells were removed by scraping, and cell death was evaluated by adding Zombie NIRTM for 30 min at RT (as recommended by the manufacturer of the Zombie NIRTM fixable viability kit; BioLegend, 1/200). After one rinse in PBS, cells were fixed in 2% PFA for 10 min at RT and finally suspended in PBS for cytometry analyses using the flow cytometer Aria SORP BD Biosciences (acquisition software FACS DIVA V7.0 BD Biosciences) with the following excitation/emission wavelengths: excitation 405 nm-CFP emission 466+/-40 nm and FRET YFP 529+/-30 nm; excitation 488nm-YFP emission 529+/-30 nm. The FRET data were quantified using the KALUZA Analysis Software v2. Results were expressed as the percentage of FRET positive cells x MFI (median fluorescence intensity). For the human brain samples, this value was normalized according to the weight of the tissue used to prepare the BD-fluid (percentage of FRET positive cells x MFI/g of tissue).

Stereotaxic injections- Four BD-fluids (500 µl) were pooled for each of the AD, PSP, PiD, and control groups (Table 1, bold), and the EVs were isolated and concentrated to a final volume of 150 µl, as described above. For each of these, 2 µl (6×10^9 vesicles) were bilaterally injected into the hippocampi of 1-month-old, anesthetized (100 mg/kg ketamine, 20 mg/kg xylazine) THY-tau30 mice and littermates (n = 5 per group; weight = 15-20g), as done previously (anterior-posterior: -2.5 mm; medial-lateral: +/- 1 mm; dorsal-ventral: -1.8 mm to bregma)⁵³. The standard injection procedure involved the delivery of EVs into THY-tau30 using a 10 µl Hamilton glass syringe with a fixed needle. After injection at a rate of 0.25 µl per minute, the needle was left in place for 5 minutes before removal to prevent any leakage of the injected material. For the experiments performed in rats (Figure S2), 3-months-old animals were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of 100 mg/kg ketamine (Ketasol, Graeb, Bern, Switzerland) and 10 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer Health Care, Uznach, Switzerland). The animals were bilaterally injected with 3 µl of EVs into the dorsal dentate gyrus (anterior-posterior: -3 mm, medial-lateral: +/- 2.5 mm, dorsal-ventral: -3.4 mm to bregma). The EVs were injected at a rate of 0.2 µl per minute and the needle was left in place for 5 minutes. In contrast to FRET assay, in all *in vivo* experiments, intact EVs were stereotactically injected without any lipofectamine.

Tissue processing, IHC, and immunofluorescence- For the human brains, the different cerebral regions (the prefrontal cortex, the occipital cortex, and the cerebellum) were dissected, and the tau lesion quantification was performed using the mirror zones. For the mice, the whole brains were dissected and the tau lesions were quantified using dedicated mice. For the human brain sections, automated IHC was performed using 4-µm-thick formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue on a BenchMark Ultra (Roche tissue diagnostics[®]) with the UltraView DAB IHC Detection Kit (Ventana[®]) and the primary Ab AT8 (1:500). For the THY-tau30 and littermate mice, at 4 weeks post-injection they were deeply anesthetized and transcardially perfused with ice-cold 0.9% saline solution and subsequently with 4% PFA for 10 minutes. The brains were immediately removed, fixed overnight in 4% PFA, washed in PBS, placed in 20% sucrose for 24h, and frozen until further use. Free-floating coronal sections (40 µm thickness) were obtained using a cryostat microtome. For IHC, the brain sections were washed in PBS-0.2% Triton X-100, treated for 30 minutes at RT with 0.3% H₂O₂, and then washed three times. Non-specific binding was blocked using a 'Mouse on Mouse' reagent (1:100 in PBS, Vector Laboratories) for 60 minutes at RT. After three rinses in PBS-0.2% Triton X-100, the sections were incubated with the primary Ab MC1 (1:1000) or AT100 (1:500) in PBS-0.2% Triton X-100 (1:1000) overnight at 4°C. After three rinses in PBS-0.2% Triton X-100, labelling was amplified by incubation with an anti-mouse biotinylated IgG (1:400 in PBS-0.2% Triton X-100, Vector Laboratories) for 60 minutes at RT. This was followed by a 120-minute application of the avidin-biotin-HRP complex (ABC kit, 1:400 in PBS, Vector Laboratories) prior to the addition of

diaminobenzidine tetrahydrochloride (Vector Laboratories) in Tris-HCl 0.2 mol/l, pH 7.6, containing 0.0015% of H₂O₂ for visualization. Brain sections were then mounted, air-dried, dehydrated by passage through a graded series of alcohol (30%, 70%, 95%, 100%) and toluene baths, and finally mounted with Vectamount (Vector Laboratories). For the rats, three weeks after the EV injections, they were deeply anesthetized and transcardially perfused with 4% PFA. A series of one-in-six 30- μ m-thick coronal sections were prepared and incubated at 4°C for 24 hours in PBS containing 0.3% Triton-X100 with the following primary Ab: rabbit anti-NeuN and mouse anti-V5. After several rinses with PBS, the sections were incubated for 90 minutes at RT in a PBS solution containing a mixture of the appropriate secondary Ab: Alexa-488 and Alexa-555 mouse secondary antibodies (1:500, Life Technologies). All of the sections were counterstained for 10 minutes with DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole; Merck; 1:5,000 dilution) to label the nuclei. IHC against V5/NeuN was followed by a final autofluorescence elimination step. To this end, Autofluorescence Eliminator reagent (EMD Millipore, 2160) was used, according to the manufacturer's instructions. Samples were mounted in VECTASHIELD. Images were acquired (series of 50-75 multiple optical sections, $z = 0.2 \mu\text{m}$) with a Zeiss LSM 880 Quasar confocal system (63x + 4x numerical zoom) equipped with Airyscan.

Tau lesion quantification- For blinded quantification of MC1 and AT100 immunoreactivity, the CA1 region of the hippocampus was chosen as the quantification zone. We selected and quantified five brain sections covering the entire hippocampus (bregmas -2.30 to -2.8) and manually counted the number of MC1 or AT100 positive somas per brain section. Results were presented as the number of neurofibrillary tangle per brain section. Human brain sections were blindly quantified using QuPath-0.2.1 software for the full mirror image of the paraffin-embedded sections. Thresholds were established using a dedicated artificial intelligence algorithm (Artificial Neuronal Network; ANN_MLP) with identified objects on a set of slides, and these segmentation thresholds remained constant throughout the analyses. Results were expressed as a percentage of tau lesions ([AT8 positive pixels/total pixels] x100).

Statistical analyses- Statistics and plots were generated using GraphPad Prism 8 software (version 8.0.0). The normality of the distributions was assessed graphically and using the Shapiro-Wilk test. In the case of a non-Gaussian distribution, the Mann-Whitney U-test was used for one-to-one comparison, and one-way non-parametric ANOVAs (Kruskal-Wallis) with post-hoc test was used for multiple comparisons. In the case of Gaussian distribution, one-way ANOVAs with post-hoc test was used for multiple comparisons. Data were reported as the mean \pm standard deviation (SD). Correlation analyses were performed using a non-parametric Spearman correlation test. The statistical tests adopted a two-tailed α level of 0.05.

Acknowledgements- This work was supported by grants from the program Investissement d’Avenir LabEx (investing in the future laboratory excellence) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer’s disease), Fondation Alzheimer (project Ectausome), Fondation pour la Recherche Médical, ANR grants (GRAND, TONIC), and the PSP France Association. Our laboratories are also supported by LiCEND (Lille Centre of Excellence in Neurodegenerative Disorders), CNRS, Inserm, Métropole Européenne de Lille, the University of Lille, I-SITE ULNE, Région Hauts de France and FEDER. This study was also supported by a Synapsis Foundation fellowship awarded to K.R. and the Lausanne University Hospital (CHUV). The authors thank the Protein Analysis Facility of the University of Lausanne for their technical support, in particular Dr. M. Quadroni. We also thank L. Culebras for help for circular graphical representation. We are grateful to the UMS-2014 US41 PLBS for access to the confocal microscopy and flow cytometry core facility Platform at the HU site of the BioImaging Center Lille for their help and for access to the cytometer. We thank Peter Davies for providing the MC1 antibody. The authors report no competing interests.

Author contributions – M.C. and L.B. designed and conceptualized the study, wrote the original draft and then reviewed the manuscript. E.L., K.R., N.D and N.T helped for the manuscript editing. E.L., R.P., R.C., S.L., T.B., S.B., V.D., A.L., S.S., C.D., J.E. and K.R. performed the experiments.

References

1. Weingarten, MD, Lockwood, AH, Hwo, SY, and Kirschner, MW (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 1858-1862.
2. Spillantini, MG, and Goedert, M (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 12: 609-622.
3. Colin, M, Dujardin, S, Schraen-Maschke, S, Meno-Tetang, G, Duyckaerts, C, Courade, JP, *et al.* (2020). From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathol* 139: 3-25.
4. Falcon, B, Zhang, W, Schweighauser, M, Murzin, AG, Vidal, R, Garringer, HJ, *et al.* (2018). Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta Neuropathol* 136: 699-708.

5. Falcon, B, Zivanov, J, Zhang, W, Murzin, AG, Garringer, HJ, Vidal, R, *et al.* (2019). Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature* 568: 420-423.
6. Fitzpatrick, AWP, Falcon, B, He, S, Murzin, AG, Murshudov, G, Garringer, HJ, *et al.* (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* 547: 185-190.
7. Duyckaerts, C, Bennefib, M, Grignon, Y, Uchihara, T, He, Y, Piette, F, *et al.* (1997). Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiol Aging* 18: 267-273.
8. Braak, H, and Braak, E (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259.
9. Delacourte, A, David, JP, Sergeant, N, Buee, L, Wattez, A, Vermersch, P, *et al.* (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52: 1158-1165.
10. Verny, M, Duyckaerts, C, Agid, Y, and Hauw, JJ (1996). The significance of cortical pathology in progressive supranuclear palsy. Clinico-pathological data in 10 cases. *Brain* 119 (Pt 4): 1123-1136.
11. Williams, DR, Holton, JL, Strand, C, Pittman, A, de Silva, R, Lees, AJ, *et al.* (2007). Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain* 130: 1566-1576.
12. Saito, Y, Ruberu, NN, Sawabe, M, Arai, T, Tanaka, N, Kakuta, Y, *et al.* (2004). Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 911-918.
13. Irwin, DJ, Brettschneider, J, McMillan, CT, Cooper, F, Olm, C, Arnold, SE, *et al.* (2016). Deep clinical and neuropathological phenotyping of Pick disease. *Ann Neurol* 79: 272-287.
14. Sotiropoulos, I, Galas, MC, Silva, JM, Skoulakis, E, Wegmann, S, Maina, MB, *et al.* (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol Commun* 5: 91.
15. Fontaine, SN, Zheng, D, Sabbagh, JJ, Martin, MD, Chaput, D, Darling, A, *et al.* (2016). DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *EMBO J* 35: 1537-1549.

16. Kang, S, Son, SM, Baik, SH, Yang, J, and Mook-Jung, I (2019). Autophagy-Mediated Secretory Pathway is Responsible for Both Normal and Pathological Tau in Neurons. *J Alzheimers Dis* 70: 667-680.
17. Katsinelos, T, Zeitler, M, Dimou, E, Karakatsani, A, Muller, HM, Nachman, E, *et al.* (2018). Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Rep* 23: 2039-2055.
18. Lee, J, and Ye, Y (2018). The Roles of Endo-Lysosomes in Unconventional Protein Secretion. *Cells* 7.
19. Merezhko, M, Brunello, CA, Yan, X, Vihinen, H, Jokitalo, E, Uronen, RL, *et al.* (2018). Secretion of Tau via an Unconventional Non-vesicular Mechanism. *Cell Rep* 25: 2027-2035 e2024.
20. Mohamed, NV, Desjardins, A, and Leclerc, N (2017). Tau secretion is correlated to an increase of Golgi dynamics. *PLoS One* 12: e0178288.
21. Pooler, AM, Phillips, EC, Lau, DH, Noble, W, and Hanger, DP (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* 14: 389-394.
22. Rodriguez, L, Mohamed, NV, Desjardins, A, Lippe, R, Fon, EA, and Leclerc, N (2017). Rab7A regulates tau secretion. *J Neurochem* 141: 592-605.
23. Sato, C, Barthelemy, NR, Mawuenyega, KG, Patterson, BW, Gordon, BA, Jockel-Balsarotti, J, *et al.* (2018). Tau Kinetics in Neurons and the Human Central Nervous System. *Neuron* 97: 1284-1298 e1287.
24. Sayas, CL, Medina, M, Cuadros, R, Olla, I, Garcia, E, Perez, M, *et al.* (2019). Role of tau N-terminal motif in the secretion of human tau by End Binding proteins. *PLoS One* 14: e0210864.
25. Tang, Z, Ioja, E, Bereczki, E, Hultenby, K, Li, C, Guan, Z, *et al.* (2015). mTor mediates tau localization and secretion: Implication for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1853: 1646-1657.
26. Perez, M, Avila, J, and Hernandez, F (2019). Propagation of Tau via Extracellular Vesicles. *Front Neurosci* 13: 698.
27. van Niel, G, D'Angelo, G, and Raposo, G (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 213-228.
28. Maas, SLN, Breakefield, XO, and Weaver, AM (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol* 27: 172-188.

29. Pernegre, C, Duquette, A, and Leclerc, N (2019). Tau Secretion: Good and Bad for Neurons. *Front Neurosci* 13: 649.
30. Wang, YP, Biernat, J, Pickhardt, M, Mandelkow, E, and Mandelkow, EM (2007). Stepwise proteolysis liberates tau fragments that nucleate the Alzheimer-like aggregation of full-length tau in a neuronal cell model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10252-10257.
31. Ruan, Z, Pathak, D, Venkatesan Kalavai, S, Yoshii-Kitahara, A, Muraoka, S, Bhatt, N, *et al.* (2020). Alzheimer's disease brain-derived extracellular vesicles spread tau pathology in interneurons. *Brain*.
32. Polanco, JC, Hand, GR, Briner, A, Li, C, and Gotz, J (2021). Exosomes induce endolysosomal permeabilization as a gateway by which exosomal tau seeds escape into the cytosol. *Acta Neuropathol*.
33. Sanders, DW, Kaufman, SK, DeVos, SL, Sharma, AM, Mirbaha, H, Li, A, *et al.* (2014). Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 82: 1271-1288.
34. Dujardin, S, Commins, C, Lathuiliere, A, Beerepoot, P, Fernandes, AR, Kamath, TV, *et al.* (2020). Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nat Med* 26: 1256-1263.
35. Saman, S, Kim, W, Raya, M, Visnick, Y, Miro, S, Jackson, B, *et al.* (2012). Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287: 3842-3849.
36. Spitzer, P, Mulzer, LM, Oberstein, TJ, Munoz, LE, Lewczuk, P, Kornhuber, J, *et al.* (2019). Microvesicles from cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease display reduced concentrations of tau and APP protein. *Sci Rep* 9: 7089.
37. Muraoka, S, DeLeo, AM, Sethi, MK, Yukawa-Takamatsu, K, Yang, Z, Ko, J, *et al.* (2020). Proteomic and biological profiling of extracellular vesicles from Alzheimer's disease human brain tissues. *Alzheimers Dement* 16: 896-907.
38. Fiandaca, MS, Kapogiannis, D, Mapstone, M, Boxer, A, Eitan, E, Schwartz, JB, *et al.* (2015). Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers Dement* 11: 600-607 e601.
39. Guix, FX, Corbett, GT, Cha, DJ, Mustapic, M, Liu, W, Mengel, D, *et al.* (2018). Detection of Aggregation-Competent Tau in Neuron-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 19.

40. Jia, L, Qiu, Q, Zhang, H, Chu, L, Du, Y, Zhang, J, *et al.* (2019). Concordance between the assessment of Aβ₄₂, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement* 15: 1071-1080.
41. Mustapic, M, Eitan, E, Werner, JK, Jr., Berkowitz, ST, Lazaropoulos, MP, Tran, J, *et al.* (2017). Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes. *Front Neurosci* 11: 278.
42. Perrotte, M, Haddad, M, Le Page, A, Frost, EH, Fulop, T, and Ramassamy, C (2020). Profile of pathogenic proteins in total circulating extracellular vesicles in mild cognitive impairment and during the progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 86: 102-111.
43. Winston, CN, Goetzl, EJ, Akers, JC, Carter, BS, Rockenstein, EM, Galasko, D, *et al.* (2016). Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimers Dement (Amst)* 3: 63-72.
44. Leroy, K, Bretteville, A, Schindowski, K, Gilissen, E, Authalet, M, De Decker, R, *et al.* (2007). Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *Am J Pathol* 171: 976-992.
45. Schindowski, K, Bretteville, A, Leroy, K, Begard, S, Brion, JP, Hamdane, M, *et al.* (2006). 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* 169: 599-616.
46. Polanco, JC, Scicluna, BJ, Hill, AF, and Gotz, J (2016). Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner. *J Biol Chem* 291: 12445-12466.
47. Boing, AN, van der Pol, E, Grootemaat, AE, Coumans, FA, Sturk, A, and Nieuwland, R (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles* 3.
48. They, C, Witwer, KW, Aikawa, E, Alcaraz, MJ, Anderson, JD, Andriantsitohaina, R, *et al.* (2018). 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* 7: 1535750.
49. Jankowsky, JL, Slunt, HH, Ratovitski, T, Jenkins, NA, Copeland, NG, and Borchelt, DR (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 17: 157-165.

50. Jeganathan, S, Hascher, A, Chinnathambi, S, Biernat, J, Mandelkow, EM, and Mandelkow, E (2008). Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J Biol Chem* 283: 32066-32076.
51. Allen, B, Ingram, E, Takao, M, Smith, MJ, Jakes, R, Virdee, K, *et al.* (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* 22: 9340-9351.
52. Holmes, BB, Furman, JL, Mahan, TE, Yamasaki, TR, Mirbaha, H, Eades, WC, *et al.* (2014). Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E4376-4385.
53. Albert, M, Mairet-Coello, G, Danis, C, Lieger, S, Caillierez, R, Carrier, S, *et al.* (2019). Prevention of tau seeding and propagation by immunotherapy with a central tau epitope antibody. *Brain* 142: 1736-1750.
54. Wang, Y, Balaji, V, Kaniyappan, S, Kruger, L, Irsen, S, Tepper, K, *et al.* (2017). The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener* 12: 5.
55. Polanco, JC, Li, C, Durisic, N, Sullivan, R, and Gotz, J (2018). Exosomes taken up by neurons hijack the endosomal pathway to spread to interconnected neurons. *Acta Neuropathol Commun* 6: 10.
56. Winston, CN, Aulston, B, Rockenstein, EM, Adame, A, Prikhodko, O, Dave, KN, *et al.* (2019). Neuronal Exosome-Derived Human Tau is Toxic to Recipient Mouse Neurons in vivo. *J Alzheimers Dis* 67: 541-553.
57. Kaufman, SK, Sanders, DW, Thomas, TL, Ruchinskas, AJ, Vaquer-Alicea, J, Sharma, AM, *et al.* (2016). Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability In Vivo. *Neuron* 92: 796-812.
58. Buee Scherrer, V, Hof, PR, Buee, L, Leveugle, B, Vermersch, P, Perl, DP, *et al.* (1996). Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol* 91: 351-359.
59. Hof, PR, Bouras, C, Perl, DP, and Morrison, JH (1994). Quantitative neuropathologic analysis of Pick's disease cases: cortical distribution of Pick bodies and coexistence with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 87: 115-124.
60. Forrest, SL, Kril, JJ, Stevens, CH, Kwok, JB, Hallupp, M, Kim, WS, *et al.* (2018). Retiring the term FTDP-17 as MAPT mutations are genetic forms of sporadic frontotemporal tauopathies. *Brain* 141: 521-534.

61. Delacourte, A, Sergeant, N, Wattez, A, Gauvreau, D, and Robitaille, Y (1998). Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol* 43: 193-204.
62. Mailliot, C, Sergeant, N, Bussiere, T, Caillet-Boudin, ML, Delacourte, A, and Buee, L (1998). Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Lett* 433: 201-204.
63. Chaunu, MP, Deramecourt, V, Buee-Scherrer, V, Le Ber, I, Brice, A, Ehrle, N, *et al.* (2013). Juvenile frontotemporal dementia with parkinsonism associated with tau mutation G389R. *J Alzheimers Dis* 37: 769-776.
64. Deramecourt, V, Lebert, F, Maurage, CA, Fernandez-Gomez, FJ, Dujardin, S, Colin, M, *et al.* (2012). Clinical, neuropathological, and biochemical characterization of the novel tau mutation P332S. *J Alzheimers Dis* 31: 741-749.
65. Buee, L, Bussiere, T, Buee-Scherrer, V, Delacourte, A, and Hof, PR (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33: 95-130.
66. Richetin, K, Steullet, P, Pachoud, M, Perbet, R, Parietti, E, Maheswaran, M, *et al.* (2020). Tau accumulation in astrocytes of the dentate gyrus induces neuronal dysfunction and memory deficits in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*.
67. Dujardin, S, Begard, S, Caillierez, R, Lachaud, C, Carrier, S, Lieger, S, *et al.* (2018). Different tau species lead to heterogeneous tau pathology propagation and misfolding. *Acta Neuropathol Commun* 6: 132.
68. Sealey, MA, Vourkou, E, Cowan, CM, Bossing, T, Quraishe, S, Grammenoudi, S, *et al.* (2017). Distinct phenotypes of three-repeat and four-repeat human tau in a transgenic model of tauopathy. *Neurobiol Dis* 105: 74-83.
69. Xu, C, Guo, J, Li, L, Wang, X, Zhou, Q, Sun, D, *et al.* (2020). Co-Expression of Three Wild-Type 3R-Tau Isoforms Induces Memory Deficit via Oxidation-Related DNA Damage and Cell Death: A Promising Model for Tauopathies. *J Alzheimers Dis* 73: 1105-1123.
70. Rosler, M, Retz, W, Retz-Junginger, P, and Dennler, HJ (1998). Effects of two-year treatment with the cholinesterase inhibitor rivastigmine on behavioural symptoms in Alzheimer's disease. *Behav Neurol* 11: 211-216.

71. Jadhav, S, Avila, J, Scholl, M, Kovacs, GG, Kovari, E, Skrabana, R, *et al.* (2019). A walk through tau therapeutic strategies. *Acta Neuropathol Commun* 7: 22.
72. Malia, TJ, Teplyakov, A, Ernst, R, Wu, SJ, Lacy, ER, Liu, X, *et al.* (2016). Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated tau by the anti-tau antibody AT8. *Proteins* 84: 427-434.
73. Jicha, GA, Bowser, R, Kazam, IG, and Davies, P (1997). Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res* 48: 128-132.
74. Hoffmann, R, Lee, VM, Leight, S, Varga, I, and Otvos, L, Jr. (1997). Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry* 36: 8114-8124.
75. Zheng-Fischhofer, Q, Biernat, J, Mandelkow, EM, Illenberger, S, Godemann, R, and Mandelkow, E (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem* 252: 542-552.
76. Yoshida, H, and Goedert, M (2006). Sequential phosphorylation of tau protein by cAMP-dependent protein kinase and SAPK4/p38delta or JNK2 in the presence of heparin generates the AT100 epitope. *J Neurochem* 99: 154-164.
77. Galas, MC, Dourlen, P, Begard, S, Ando, K, Blum, D, Hamdane, M, *et al.* (2006). The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *J Biol Chem* 281: 19296-19304.
78. Dujardin, S, Begard, S, Caillierez, R, Lachaud, C, Delattre, L, Carrier, S, *et al.* (2014). Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS One* 9: e100760.
79. Hagel, L, Östberg, M, and Andersson, T (1996). Apparent pore size distributions of chromatography media. *Journal of Chromatography A* 743: 33-42.
80. Kulak, NA, Pichler, G, Paron, I, Nagaraj, N, and Mann, M (2014). Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods* 11: 319-324.

81. Cox, J, and Mann, M (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26: 1367-1372.
82. Cox, J, Neuhauser, N, Michalski, A, Scheltema, RA, Olsen, JV, and Mann, M (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 10: 1794-1805.
83. Baietti, MF, Zhang, Z, Mortier, E, Melchior, A, Degeest, G, Geeraerts, A, *et al.* (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14: 677-685.
84. Tyanova, S, Temu, T, Sinitcyn, P, Carlson, A, Hein, MY, Geiger, T, *et al.* (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13: 731-740.
85. Schwanhausser, B, Busse, D, Li, N, Dittmar, G, Schuchhardt, J, Wolf, J, *et al.* (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337-342.
86. d'Orange, M, Auregan, G, Cheramy, D, Gaudin-Guerif, M, Lieger, S, Guillemier, M, *et al.* (2018). Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat. *Brain* 141: 535-549.

Abbreviations- Alzheimer disease (AD), brain-derived extracellular vesicles (BD-EVs), brain-derived fluid (BD-fluid), extracellular vesicles (EVs), Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), Gene Ontology Cellular Components (GOCC), immunohistochemistry (IHC), Intensity-based absolute quantification (IBAQ), interstitial fluid (ISF), Monoclonal antibody (mAb), nanoparticle tracking analysis (NTA), neurofibrillary tangles (NFT), Pick's disease (PiD), paraformaldehyde (PFA), phosphate buffered saline (PBS), phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), progressive supranuclear palsy (PSP), proteinase K (PK), repeat domain (RD), room temperature (RT), size-exclusion chromatography (SEC).

Figure legends

Figure 1- Murine BD-EVs characterization- EVs from murine BD-fluid were isolated using SEC to separate EVs from free-floating proteins. They were separated by sepharose resin columns in PBS and 500 μ l per fraction were collected. (A) EV concentrations were quantified per fraction using NTA and expressed as vesicles/ml (A, black columns); the amount of total protein was determined using either UV spectrophotometry (A, white columns) or a silver gel coloration (B). (C) The EVs' morphology was studied using electron microscopy in pooled fractions 1-4 (F1-4). The scale bar is indicated on the figure. (D) The EVs' size distribution was determined using NTA in pooled fractions 1-4 (F1-4). (E) Circular barplot showing IBAQ intensity scores obtained for 20 selected GOCC terms after quantitative proteomic analysis of F1-4 fractions. (F) Table listing human gene names corresponding to proteins recommended by MISEV 2018 detected in the F1-4 fractions after MS-based proteomic analysis. * used for families of multiple proteins, for example for integrins: ITGA* indicates any integrin alpha chain. (G) The intravesicular tau (+PK-RIPA, with RIPA for ELISA tau detection) or the intra- plus the extravesicular tau (-PK+RIPA) was quantified using ELISA from murine BD-EVs (3 months-old THY-tau30). A positive control showing the global lysis of tau was also shown (+PK+RIPA). ns= not significant. For A and D, mean of 3 independent experiences are shown, for B and C, illustrative data are representative of at least 3 independent experiences.

Figure 2- BD-EVs of a transgenic mouse model of tauopathy contain tau seeds- (A) EVs of TgAPP/PS1 (6 months old, n = 6), wild-type littermate mice (1 [n = 8], 3 [n = 6], and 6 [n = 8] months old), and THY-tau30 (1 [n = 7], 3 [n = 8], and 6 [n = 8] months old) were applied to the HEK-tau biosensor cells, and the FRET signal was quantified using flow cytometry. 2 \square M of sonicated K18 fibrils were used as a positive control (+) and PBS was used as a negative control (-). (B) BD-EVs isolated from 3-month-old THY-tau30 (F1-4) were further ultracentrifuged to deplete EVs. Pellet

containing EVs (P) and supernatant (S) were applied to the biosensor assay. (C) Tau ELISA after tau immunodepletion (with or without sonication) from BD-EVs isolated from 3-month-old THY-tau30. HT7 was used to immunodeplete tau whereas IgG1 was used as a negative control of immunodepletion. (D) After tau immunodepletion of sonicated BD-EVs, fractions were applied to the biosensor assay. For A, B and D, results are expressed as the percentage of the FRET signal x MFI (% FRET x MFI). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; # $p < 0.05$, ##### $p < 0.0001$, or **** $p < 0.0001$.

Figure 3- Tau lesions in human brain tauopathies- Prefrontal (PF), occipital (OC) and cerebellum (Cb) brain regions were dissected post-mortem from non-demented controls (n = 5), patients with PSP (n = 5), PiD (n = 5), and AD (n = 10). (A) IHC of tau lesions using the AT8 antibody in mirror zones. Scale bars are indicated on the figure. (B) Human brain sections were blindly quantified using QuPath-0.2.1 software. Results are expressed as a percentage of tau lesions ([AT8 positive pixels/total pixels] x100). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, or **** $p < 0.0001$.

Figure 4- Seed-competent species are found in BD-EVs in human tauopathies- BD-fluid was purified from the different brain regions and EVs were isolated from the 500 μ l of BD-fluid. (A) EVs concentration was analyzed using NTA and expressed as vesicles per gram/ml of tissue used to prepare the BD-fluid, and (B) global EVs tau content was determined by ELISA (INNOTEST® hTAU Ag, Fujirebio). Results are expressed as Tau (pg/ml) / g of tissue. (C) BD-EVs were applied to the HEK-tau biosensor cells and the FRET signal was quantified using flow cytometry. Results are expressed as % FRET x MFI / g of tissue. (D) Non-parametric Spearman correlation between the post-mortem delay (PMD) and the FRET signal generated by BD-EVs from the AD prefrontal cortex (PF), AD occipital cortex (OC), and AD cerebellum (Cb) regions. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Figure 5- AD BD-EVs efficiently seed host human mutated tau in young THY-tau30 mice- (A) Four AD, four PiD, four PSP, and four non-demented control BD-fluid were purified (Table 1 in bold), and isolated EVs were pooled. 2 μ l (6×10^9 EVs) were applied to the HEK-tau biosensor cells, and the FRET signal was quantified using flow cytometry. Results are expressed as % FRET x MFI. (B) EVs (6×10^9 EVs) were bilaterally injected into the hippocampi of 1-month-old THY-tau30 or wild-type mice littermates (n = 5). Mice were sacrificed four weeks post-injection and the tau pathology was analysed by DAB-immunostaining with the MC1 (upper) or AT100 (lower) antibodies. Sections from the hippocampus (injection site) are shown. Scale bars are indicated on the figure. (C) The number of MC1 (left) or AT100 (right) immunoreactive neurons per brain section was quantified (Bregma -2.3 to -2.8 mm), and the data are presented as mean \pm SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure Legends

Figure S1- HSP90 and CD63 are found associated to F1-4- (A) The presence of the HSP90 in murine BD-EVs (F1-4) is validated by western-blot. (B) The presence of the CD63 in human BD-EVs (F1-4) is validated by immunogold electron microscopy.

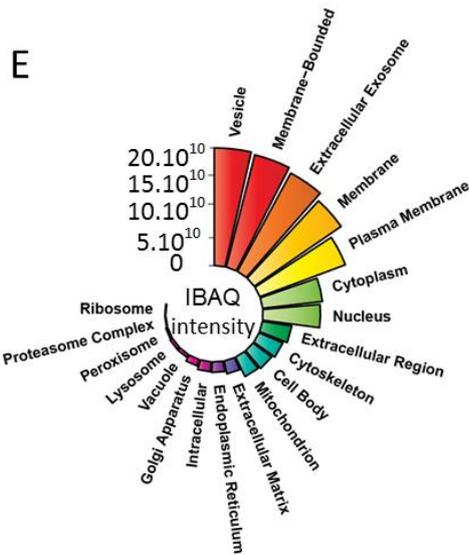
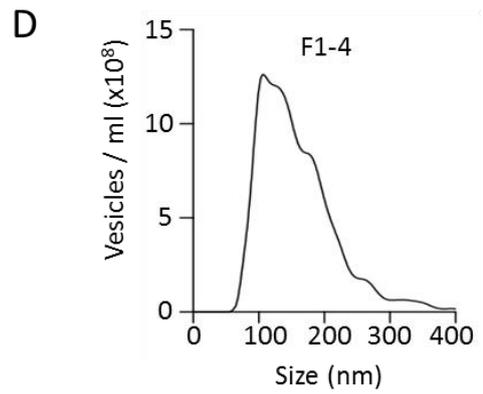
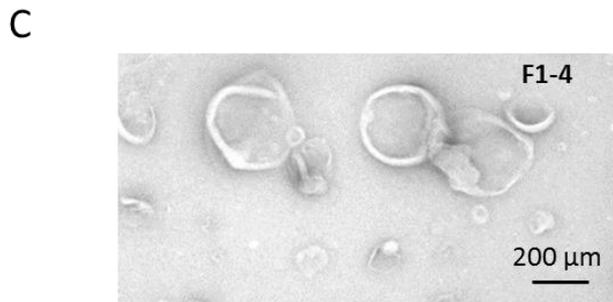
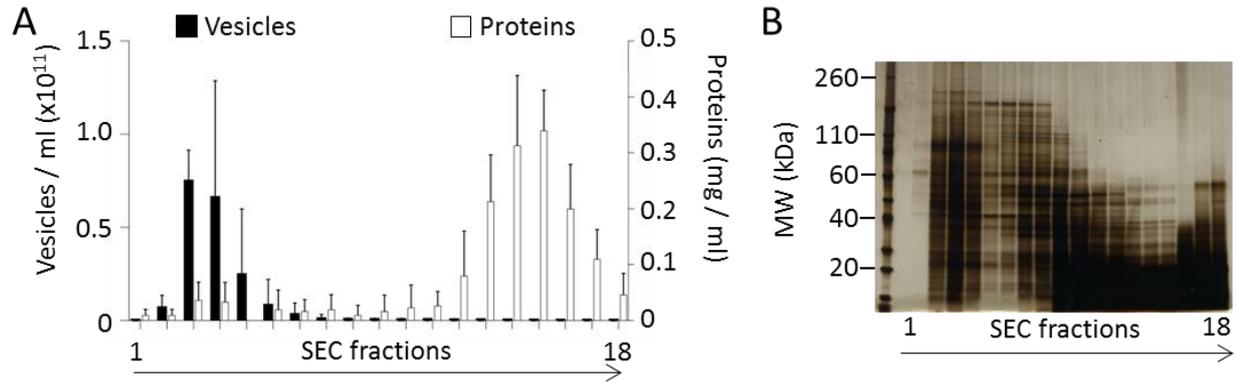
Figure S2- Tau lesions in THY-tau30 mice- Illustration of tau lesions in hippocampal sections of TgAPP/PS1 (6 months old), wild-type littermate mice, and THY-tau30 (1, 3, and 6 months old) using antibodies that recognize pathological forms of tau, MC1 (a-g) or AT100 (h-n). In f-n, a few neurofibrillary tangles are shown (arrows). Scale bars are indicated on the figure. Enlargements of CA1 layers (squares) are shown at 6 months for THY-tau30 mice. Pyr= Pyramidal, DS= Dorsal Subiculum, LMol = Lacunosum Molecular layer.

Figure S3- Human BD-EVs characterization- BD-EVs were isolated from BD-fluid using SEC to separate EVs from free-floating proteins and 500 μ l per fraction were collected. (A) EV concentration was quantified in a NTA and expressed as vesicles/ml (A, black columns); the amount of total protein was determined using either UV spectrophotometry (A, white columns) or a silver gel coloration (B). (C) The EV morphology was studied using electron microscopy for pooled fractions 1-4 (F1-4). The scale bars are indicated on the figure. (D) The EVs' size distribution was studied using NTA in pooled fractions 1-4 (F1-4). (E) Circular barplot showing IBAQ intensity scores obtained for different 20 selected GOCC terms after quantitative proteomic analysis of F1-4 fractions. (F) Table listing human gene names of proteins recommended by MISEV 2018 detected in the F1-4 fractions after MS-based proteomic analysis. * used for families of multiple proteins, for example for integrins: ITGA* indicates any integrin alpha chain. For A and D, mean of 3 independent experiences are shown; for B and C, illustrative data are representative of at least 3 independent experiences.

Figure S4- Tau transfer by EVs. (A) The htau1N4R-V5 isoform was expressed in HeLa cells using lentiviral technology. (B) EVs isolated from the media and applied to receiving cells that don't express htau1N4R-V5 were found to transfer tau between cells. In (A) and (B) tau is visualized in red with a V5 antibody; the nuclei are labelled with DAPI and visualized in blue. (C and D) Primary neurons were either infected or not infected with lentiviral vectors to overexpress htau-1N4R-V5, and the EVs

isolated from the supernatant were injected into the hippocampi of naïve rats. Confocal micrographs show hippocampal neurons (NeuN+: green) positive for htau1N4R-V5, 50 days after the intrahippocampal injections of both the control EVs (C) and the EVs derived from the htau1N4R primary culture (D). Scale bars are indicated on the figure.

Table 1- Demographic, biological, and clinical characteristics of the human brain sample donors- Brain samples used for BD-fluid isolation are listed (n = 5 non-demented controls, n = 10 AD, n = 10 PSP, and n = 5 PiD). The items in bold indicate the AD patients, PSP patients, PiD patients, and non-demented controls selected for the intracranial delivery of the BD-EVs in mice.



F

MISEV 2018 recommended category	1a	2a	3a	4a	5a
Detected	Adam10; Bsg; Cd47; Cd81; Cd82;	Anxa*; Arf6; Chmp*; Ehd*; Flot1; Flot2;	Alb; Apoa1	Hist1h **	
Non-detected	Gna*; Hspg*; Igta*; Igtb*; Lamp1; Lamp2; Nt5e; Sdc*	Hsp90ab1; Hspa8; Mapt; Pdcd6ip; Rhoa; Sdcbp; Tsg101; Vps4b	Apoa2; Apob; Apob100	Lmna	Egf; Fgf1; Fgf2; Tfng; Il*; Pdgf*; Tgfb1; Tgfb2; Vegfa

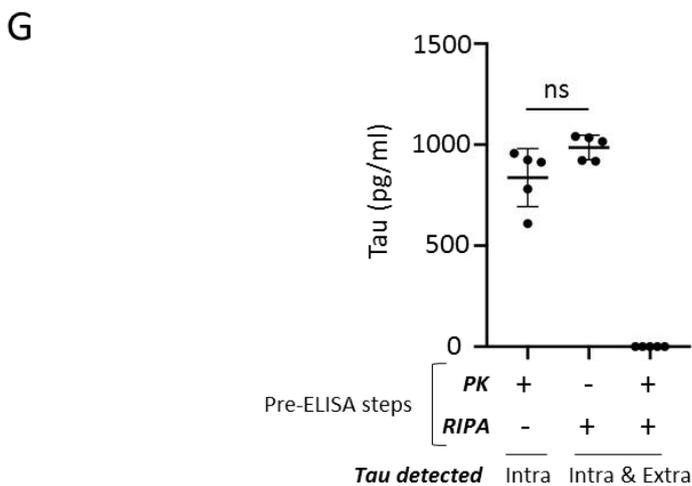
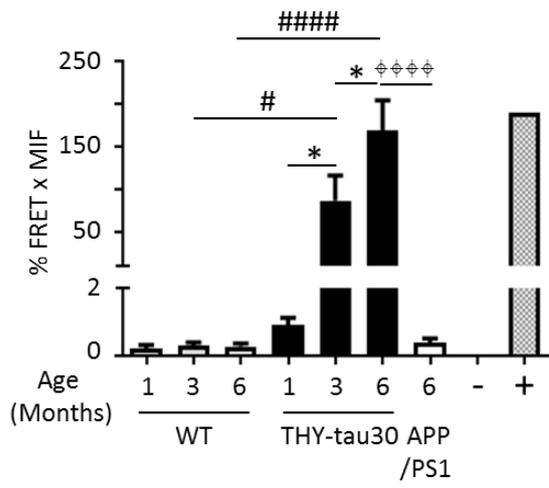
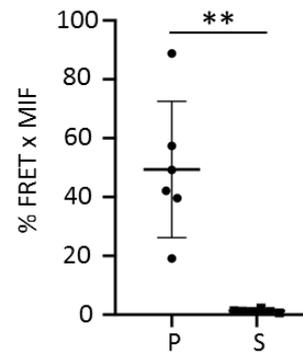


Figure 1

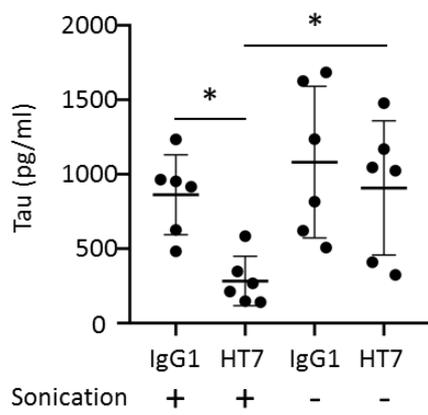
A



B



C



D

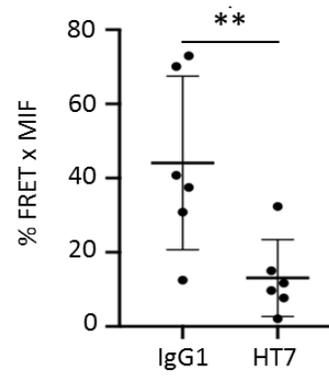
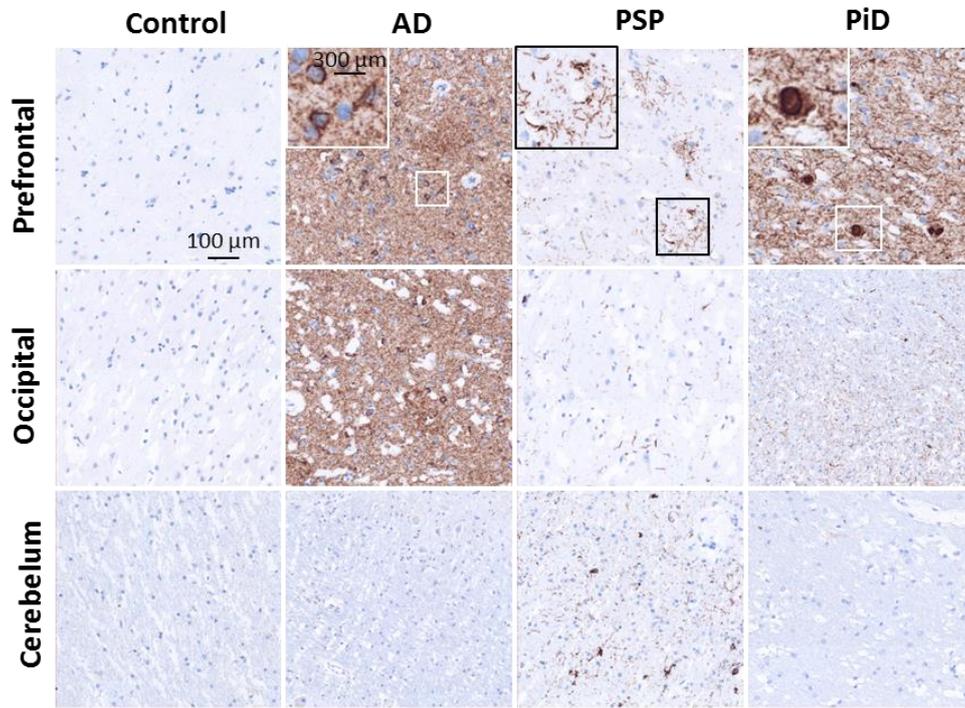


Figure 2

A



B

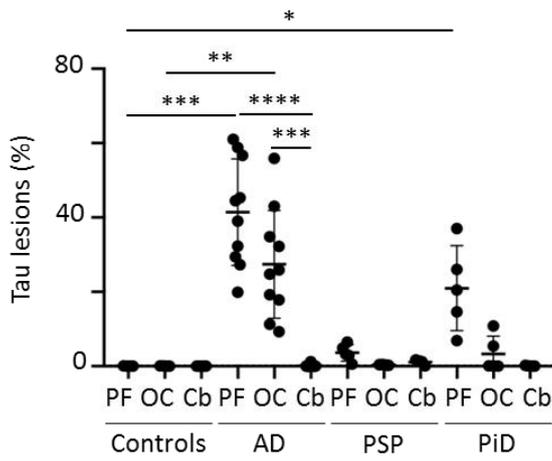
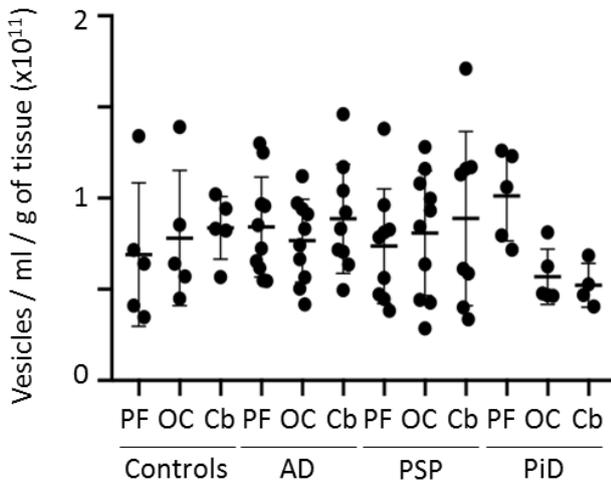
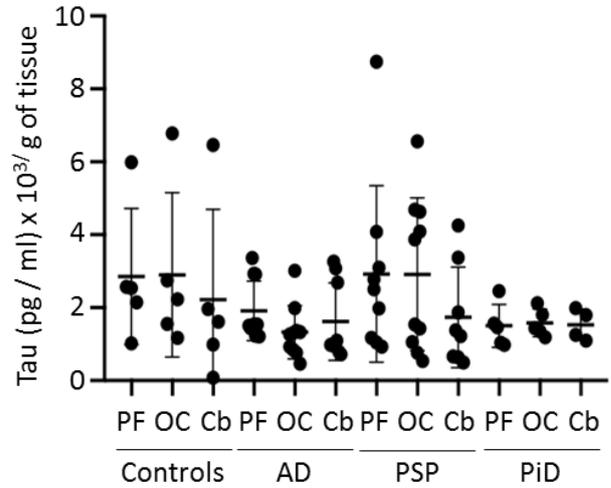


Figure 3

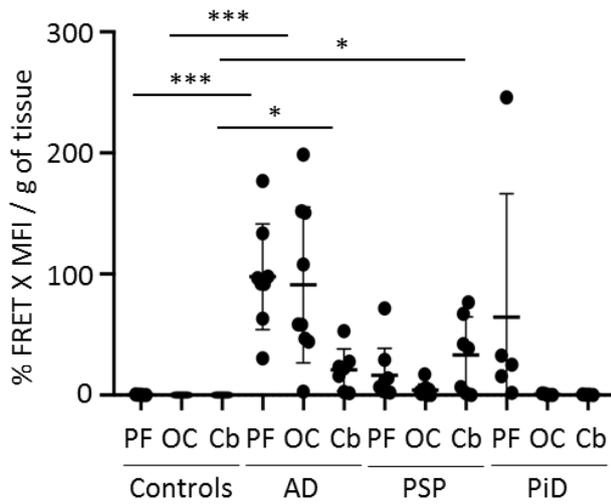
A



B



C



D

PMD versus.	PF-AD	OC-AD	Cb AD
Spearman (r)	-0.6587	-0.6307	0.1
P value (two-tailed)	0.0839	0.1413	0.9500
P value summary	NS	NS	NS

Figure 4

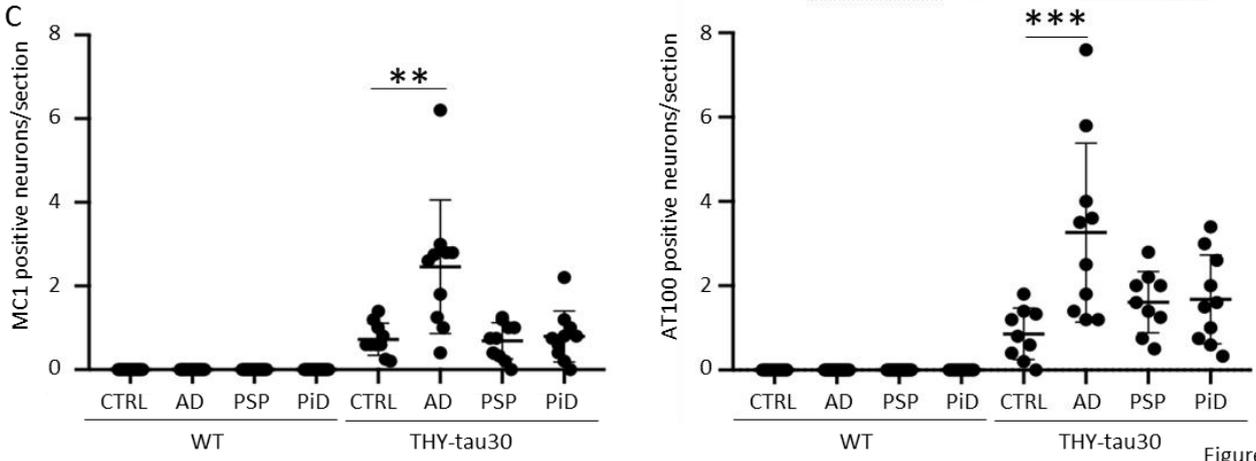
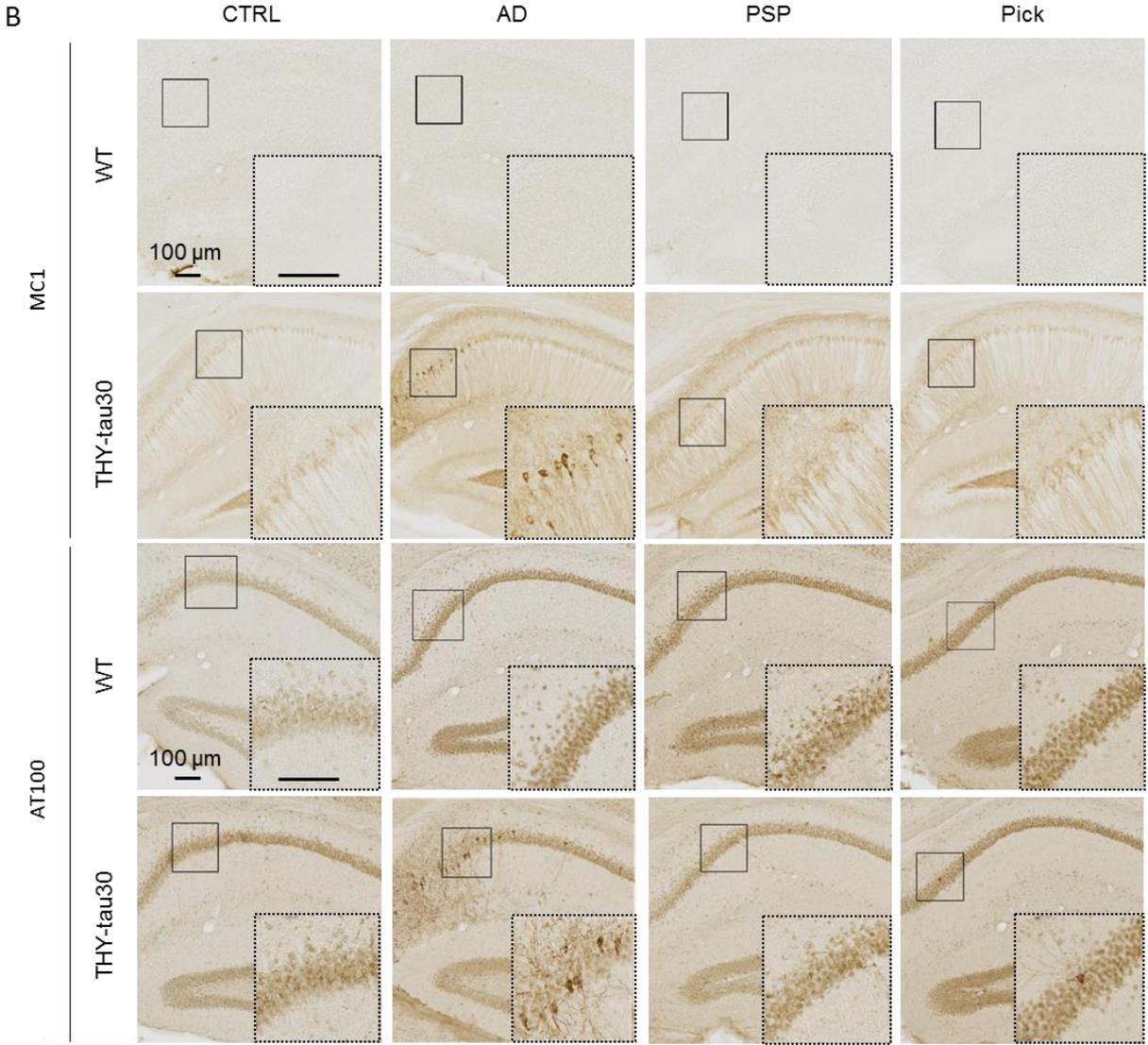
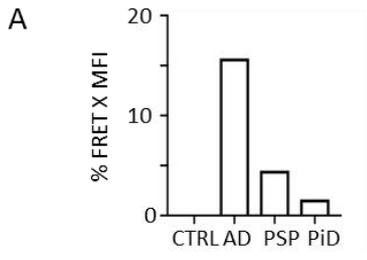
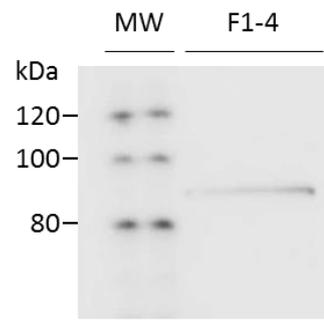


Figure 5

A



B

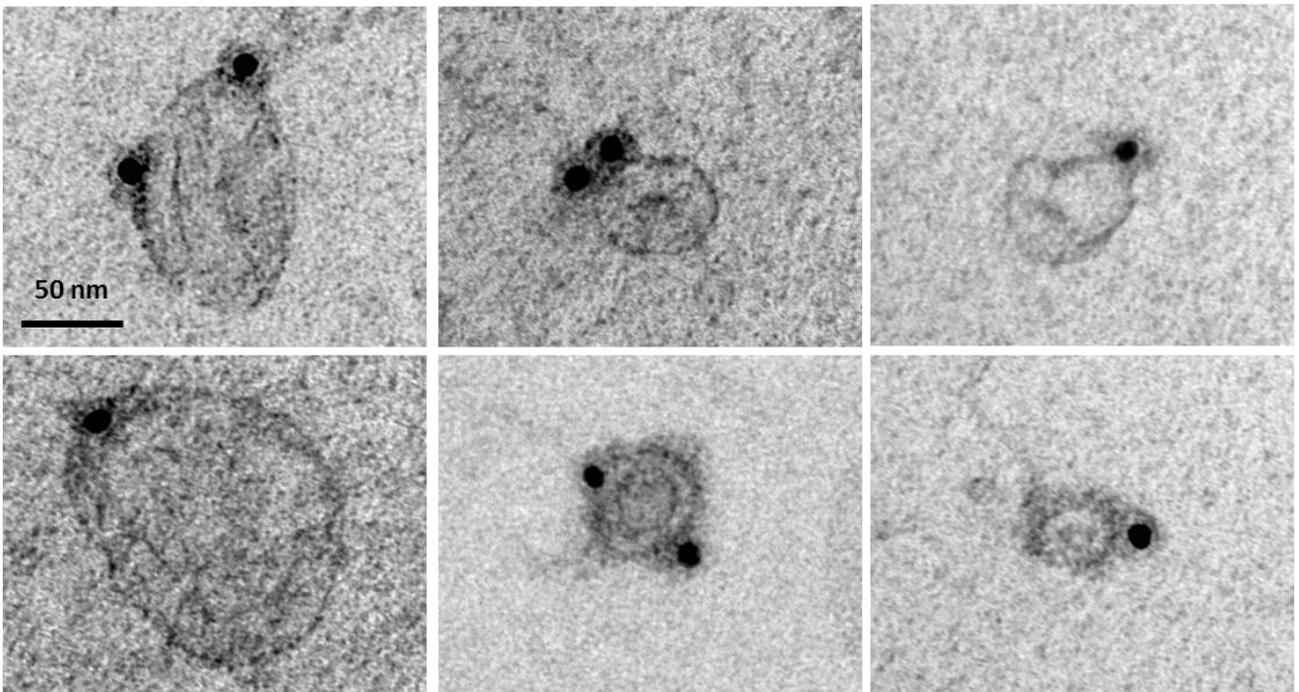


Figure Supp 1

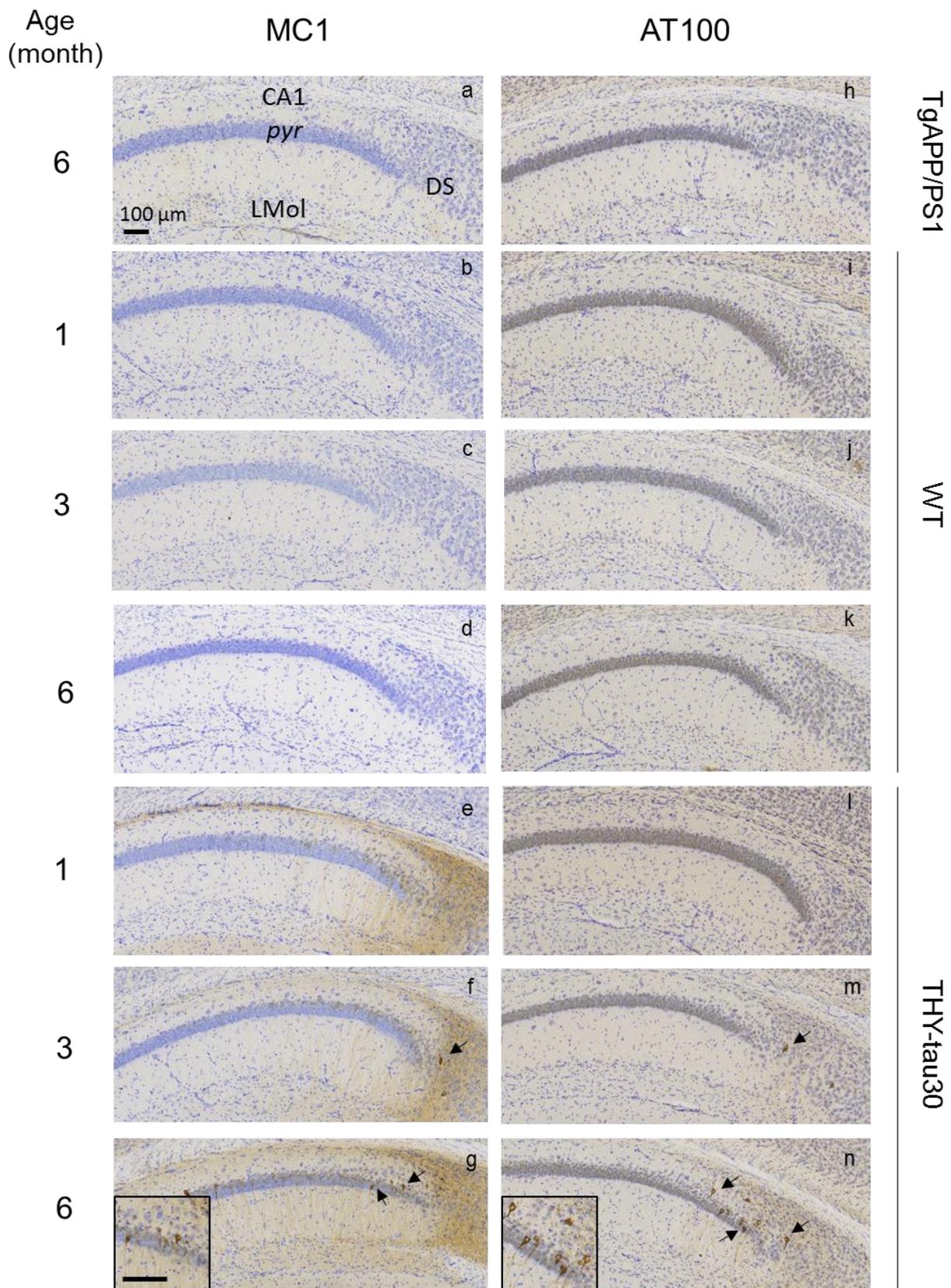
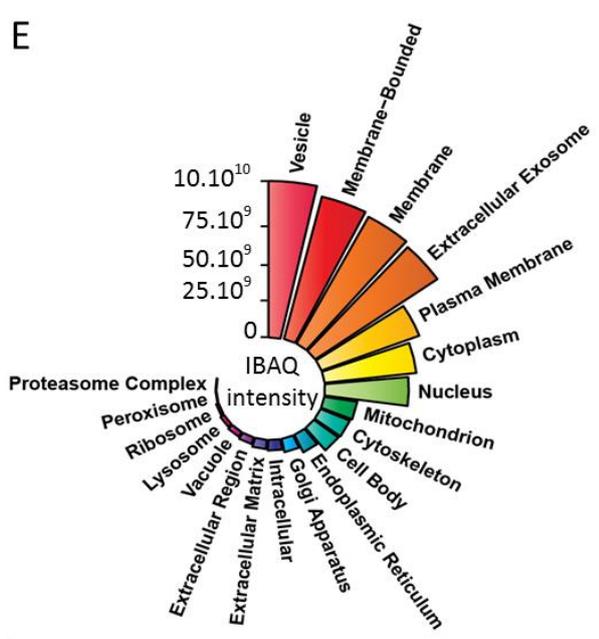
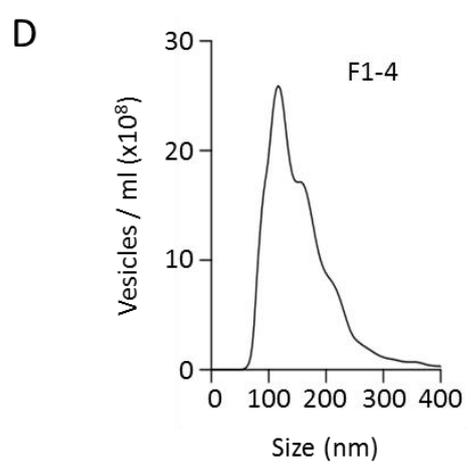
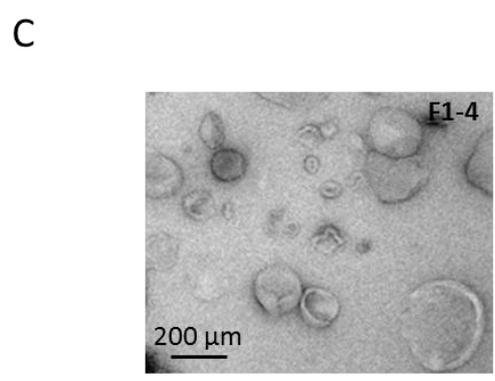
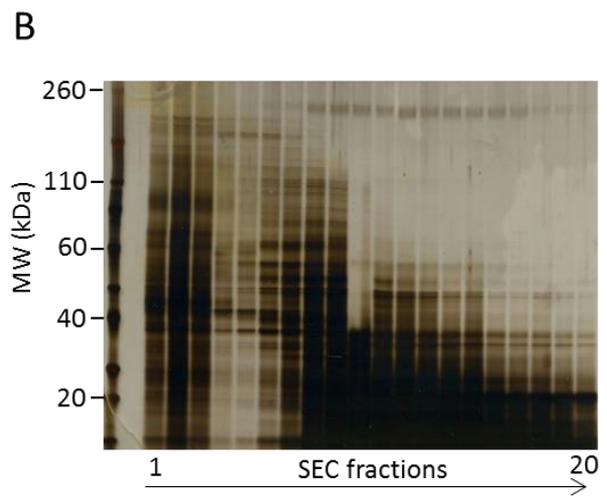
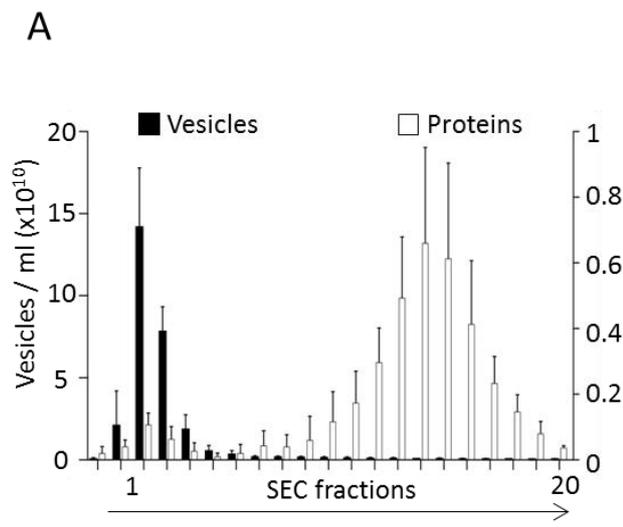


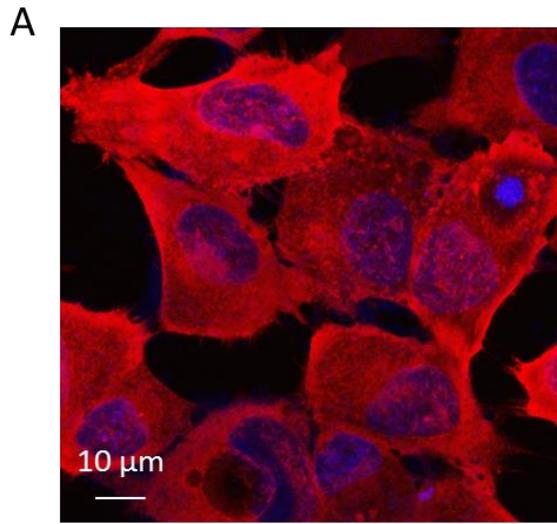
Figure Supp 2



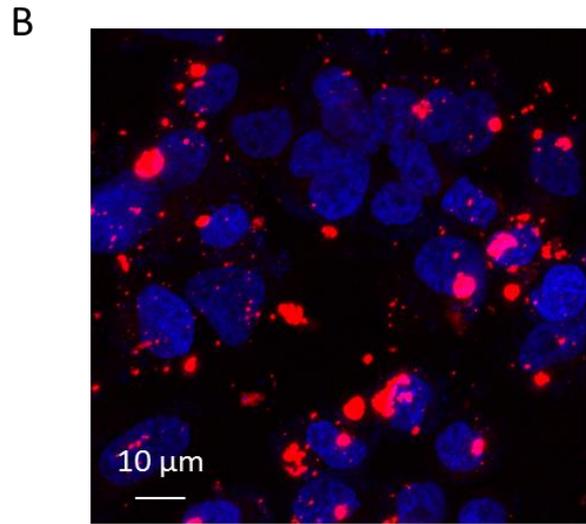
F

MISEV 2018 recommended category	1a	2a	3a	4a	5a
Detected	ADAM10; BSG; CD47; CD55; CD59; CD63; CD81; CD82; GNA*; HLA-A; HSPG*; IGTA*; IGTB*; LAMP1; LAMP2; NTSE; SDC*	ANXA*; ARF6; CAV*; CHMP*; EHD*; FLOT1; FLOT2; HSP90AB1; HSPA8; MAPT; PDCD6IP; RHOA; SDCBP; TSG101; VPS4A; VPS4B	APOA1; APOB;	HIST1H*; LMNA	FGF1
Non-detected	H2-D; H2-K; H2-Q; HLA-B; HLA-C; SHH; TFR2	ARRDC1	APOA2; APOB100; ALB		EGF; FGF2; TFNG; IL*; PDGF*; TGFB1; TGFB2; VEGFA

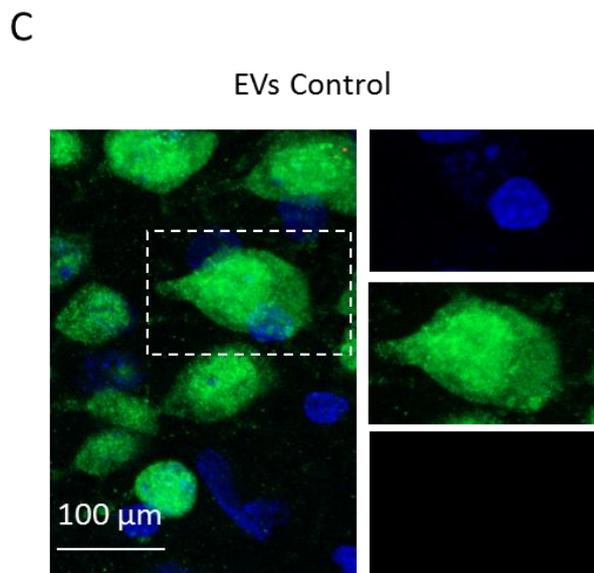
Figure Supp 3



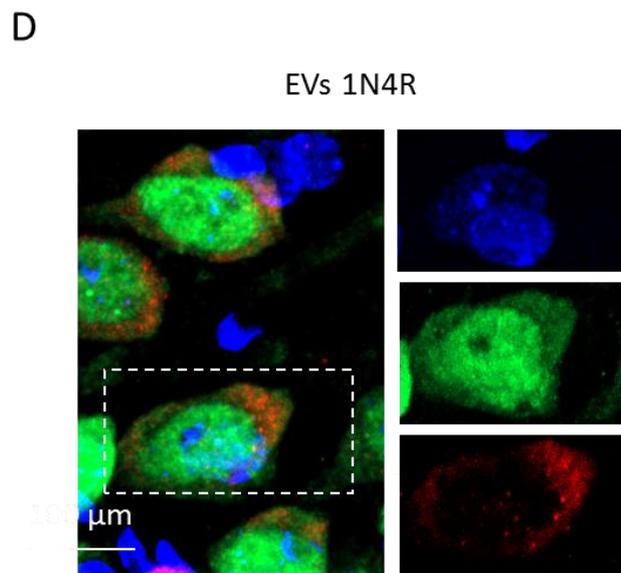
TauV5, donor cells



TauV5, receiving cells



DAPI / NeuN / V5



DAPI / NeuN / V5

Table 1

Sex	Death (y)	PMI (h)	Diagnosis	Tau lesions	Braak	Thal	Cause of death
M	78	19	Control	none	0	0	invasive aspergillosis
F	82	NA	Control	none	I	1	pericarditis
M	23	24	Control	none	0	0	myocarditis
M	59	13	Control	none	0	0	Septic shock
M	41	11	CTRL	none	0	0	suffocation
M	70	30	AD	NFT	VI	4	
F	63	15	AD	NFT	VI	4	
F	60	24	AD	NFT	VI	5	
F	82	84	AD	NFT	VI	5	
F	87	24	AD	NFT	VI	5	
F	71	4	AD	NFT	VI	4	
M	64	20	AD	NFT	VI	4	
M	66	27	AD	NFT	VI	5	
F	66	16	AD	NFT	VI	4	
M	69	6	AD	NFT	VI	4	
M	74	9	PSP	NFT and GFT	NA	1	
M	90	36	PSP	NFT and GFT	NA	2	
M	88	3	PSP	NFT and GFT	NA	4	
M	69	17	PSP	NFT and GFT	NA	0	
F	79	4	PSP	NFT and GFT	NA	0	
M	65	18	PSP	NFT and GFT	NA	0	
M	82	4	PSP	NFT and GFT	NA	0	
M	64	18	PSP	NFT and GFT	NA	0	
F	77	9	PSP	NFT and GFT	NA	3	
M	57	20	PSP	NFT and GFT	NA	1	
M	57	22	PiD	Pick bodies	NA	0	
M	71	21	PiD	Pick bodies	NA	3	
F	78	11	PiD	Pick bodies&NFT	NA	0	
M	68	15	PiD	Pick bodies	NA	0	
M	68	8	PiD	Pick bodies	NA	0	

Publication 2 : Vésicules extracellulaires et système nerveux

Soumission dans Médecine/Sciences

Les vésicules extracellulaires : actrices de la communication entre les cellules du système nerveux

Élodie Leroux¹, Romain Perbet¹, Luc Buée¹, Morvane Colin¹

1. Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, U1172 - LilNCog - Lille Neuroscience & Cognition, F-59000 Lille, France.

morvane.colin@inserm.fr

Résumé

Les vésicules extracellulaires (VE) sont libérées par une grande diversité de cellules et contiennent des protéines, des ARN et des lipides échangés entre ces cellules. Elles représentent donc un mode de communication intercellulaire majeur aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques. C'est notamment le cas dans le système nerveux (SN) où les neurones et les cellules gliales forment un réseau très dense et où des milliards de connexions s'établissent. Cette revue fournit un aperçu des différents rôles joués par les VE dans un cerveau sain lors du renforcement des réseaux par exemple, mais également dans un cerveau malade où les VE participent, entre autres, à la progression des maladies neurodégénératives et tumorales.

Vésicules extracellulaires et homéostasie cérébrale

Dans le cerveau, un organe très dense où la mobilité cellulaire est restreinte, neurones et cellules gliales (microglie, oligodendrocytes, astrocytes) sécrètent des vésicules extracellulaires (VE) pour communiquer. Examinons, tout d'abord, comment les différentes populations cellulaires peuplant le cerveau utilisent ces VE pour garantir l'homéostasie cérébrale lors du développement, de la transmission synaptique ou encore de la myélinisation axonale (**Figure 1**, panel supérieur).

Développement du système nerveux central et des réseaux

Le développement du système nerveux central (SNC) implique des processus de multiplication, de migration et de différenciation cellulaires parfaitement organisés. Cela se fait par un jeu d'expression de multiples facteurs de transcription échangés entre les cellules du SNC en développement. Le rôle des VE dans le transport de ces différentes molécules semble important. Par exemple, des VE issues de cultures neuronales dérivées de cellules souches pluripotentes humaines (hIPSc) induisent la prolifération et la différenciation de ces cellules en culture. Une analyse protéomique de ces VE a révélé la présence de facteurs impliqués dans ces deux processus, de même que dans la migration cellulaire [1]. Les astrocytes, tout comme les cellules microgliales, fournissent également un support trophique aux neurones. Les VE astrocytaires peuvent présenter à leur surface la protéine synapsine-1 qui se lie au récepteur neuronal NCAM (*neuronal cell adhesion molecule*). L'internalisation de cette protéine après sa fixation à son récepteur par les neurones va promouvoir la survie neuronale et favoriser la croissance neuritique [2]. En réponse à l'ATP, des protéines impliquées dans la croissance neuritique, la ramification dendritique, la régulation de la transmission synaptique et la promotion de la survie neuronale, sont également sécrétées dans des VE astrocytaires [3]. Enfin, les VE microgliales, de par leur contenu en protéines associées à la survie et à la croissance, peuvent aussi activer la croissance neuritique [4].

Modulation de l'activité électrique neuronale

Les neurones sont les cellules les plus connues et étudiées du SN. Ils établissent entre eux plusieurs dizaines de milliers de connexions, appelées synapses, qui transmettent des informations *via* des signaux électriques. Ces signaux sont à l'origine d'une libération par le neurone pré-synaptique, de neurotransmetteurs, excitateurs ou inhibiteurs, qui se lient à des récepteurs présents au niveau du neurone post-synaptique. Cette liaison permet une entrée de calcium dans le neurone post-synaptique et l'activation de seconds messagers capables de l'activer ou de l'inhiber. En réponse à une activité électrique excitatrice, les neurones sécrètent des VE qui seront internalisées par d'autres neurones [5–7]. Les VE microgliales semblent pouvoir réguler l'équilibre entre excitation et inhibition de la neurotransmission, soit en stimulant l'activité électrique neuronale excitatrice [8], soit en bloquant la transmission de l'information *via* l'activation de récepteurs présynaptiques exprimés par des neurones inhibiteurs [9].

Le couplage entre activité synaptique et libération vésiculaire pourrait également être utilisé dans des processus associés à la plasticité synaptique [10]. La capacité des synapses à être modifiées après stimulation permet la formation et le renforcement de circuits neuronaux garantissant notamment nos capacités d'associations et de mémoire. Cette plasticité synaptique dépend de signaux antérogrades (neurones pré- vers post-synaptiques) et rétrogrades (neurones post- vers pré-synaptiques) qui pourraient être véhiculés par les VE. Par exemple, la synaptotagmin 4, une protéine impliquée dans la plasticité synaptique, est transportée de façon antérograde par les VE. Ce transport induit alors des signaux rétrogrades nécessaires à l'ajustement de l'activité du neurone pré-synaptique et à la croissance synaptique [11]. Les synapses actives peuvent également libérer des VE qui iront stimuler la microglie pour phagocyter les synapses inactives et donc promouvoir leur élimination [12]. La plasticité synaptique implique également des modifications des synapses, transitoires ou durables, suite à des changements de l'expression de gènes [13]. Ces changements nécessitent des trafics d'ARN messagers (ARNm) qui peuvent être contenus dans les VE [14]. Des micro-ARN, également contenus dans les VE, peuvent participer à ces modifications, en régulant l'expression des ARNm dans la cellule réceptrice. En réponse à une activité électrique, des micro-ARN contenus dans les neurones pré-synaptiques sont en effet libérés dans des VE [15].

Myélinisation axonale

Les oligodendrocytes sont des cellules gliales en charge de la myélinisation des axones. La myéline, constituée de différentes protéines, forme une gaine autour des axones qui permet une transmission de l'information électrique beaucoup plus rapide au niveau des neurones. En l'absence de neurones, les VE oligodendrocytaires inhibent la formation de la gaine de myéline [16]. Mais quand les neurones sont présents, la libération de neurotransmetteurs excitateurs, suite à une stimulation électrique, peut entraîner, dans les oligodendrocytes périaxonaux, la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane, ce qui conduit au relargage d'exosomes dans le milieu extracellulaire [17]. Des VE oligodendrocytaires contiennent des protéines constitutives de la myéline et des protéines associées à la protection contre le stress cellulaire [18]. Ces VE participeraient ainsi à la formation et au maintien de la gaine de myéline.

Vésicules extracellulaires et maladies du système nerveux

Ces dernières années, les VE sont apparues comme des actrices majeures dans la propagation des maladies neurodégénératives, dans la neuroinflammation du SN, et dans la tumorigénèse. Néanmoins, nous verrons qu'elles peuvent également avoir un rôle bénéfique pour faire face à ces pathologies. Nous fournissons un bref aperçu de certains des thèmes émergents reliant les VE aux maladies neurologiques, comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques ou le gliome (**Figure 1**, panel inférieur).

Les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par une mort progressive des cellules du SN. Les régions cérébrales et les types neuronaux touchés dépendent de la maladie neurodégénérative et expliquent la variété des symptômes. Depuis de nombreuses années, la formation d'agrégats intracellulaires de différentes protéines a été décrite.

Initialement décrit dans les maladies à prions [19], dont fait partie la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la protéine prion intracellulaire anormalement repliée est capable de convertir la protéine prion normale en une protéine de forme anormale, induisant ainsi

le processus d'agrégation protéique que l'on observe dans ces pathologies. L'aggravation symptomatologique de la maladie est liée à la propagation de ces protéines anormales qui, une fois sécrétées dans le milieu extracellulaire, sont capturées par une autre cellule où la conversion et l'agrégation de la protéine prion se répète. Cette observation a conduit à penser que les VE pouvaient être impliquées dans la propagation de la pathologie. En effet, la protéine prion anormale est retrouvée associée aux VE [20] et la stimulation de la sécrétion vésiculaire augmente son transfert intercellulaire *in vitro* [21]. *In vivo*, l'injection de ces VE dans le cerveau de souris induit une pathologie de type prion [22].

Ces premières données issues des maladies à prions ont conduit à l'hypothèse que le comportement de la protéine prion pourrait s'étendre à d'autres protéines impliquées dans certaines maladies neurodégénératives. La propagation de protéines anormalement repliées via les VE a ainsi également été décrite dans la maladie de Parkinson [23], la sclérose latérale amyotrophique [24] et la maladie d'Alzheimer [25]. Dans cette dernière, deux lésions, liées à l'agrégation de deux protéines distinctes, co-existent : les peptides β -amyloïde ($A\beta$), qui forment des plaques séniles extracellulaires, et la protéine tau, à l'origine des dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires. Dans plusieurs modèles *in vitro*, il a été montré que la protéine tau pouvait être sécrétée dans des VE [26]. Des espèces particulières de protéines tau capables d'entraîner le mauvais repliement et l'agrégation de protéines tau normales, ont également été décrites dans des VE isolées à partir de cerveaux de souris transgéniques exprimant une protéine tau humaine mutée [27] et, plus récemment, à partir de cerveaux de patients [28]. Injectées dans le cerveau de souris, ces vésicules sont capables d'induire une pathologie et participeraient ainsi à la propagation de celle-ci. La protéine tau est également sécrétée dans le milieu extracellulaire sous une forme non vésiculaire [28]. Cependant, les protéines tau présentes dans les VE semblent être plus efficaces pour déclencher les processus de conversion et d'agrégation [28]. Les VE microgliales participeraient également à la propagation de la pathologie tau ; l'inhibition de leur biogénèse ralentit en effet la progression de la pathologie tau *in vivo* [29].

Concernant les plaques séniles, des VE dérivées de cerveaux de patients et contenant des oligomères de peptides $A\beta$ sont internalisées dans des cultures neuronales dérivées d'hIPSc (*human induced pluripotent stem cells*) et induisent une toxicité [30]. Les VE astrocytaires accélèrent également l'agrégation des peptides $A\beta$ et empêchent leur

clairance par la microglie *in vitro*. Le blocage de la sécrétion de ces vésicules entraîne une diminution de la formation des plaques et améliore la cognition *in vivo* [31].

Certaines études mettent cependant en évidence un rôle bénéfique des VE dans ces pathologies. En effet, des VE neuronales sont capables de se lier à des assemblages de peptides A β et de les diriger vers la microglie afin de promouvoir leur dégradation et ainsi réduire les niveaux d'A β extracellulaires [32]. Les peptides A β sont capables d'inhiber la plasticité synaptique mais des VE dérivés du liquide céphalo-spinal (LCS) humain permettent d'inverser cet effet. Dans ce cas, la présence à la surface de ces VE de protéines se liant aux peptides A β pourraient jouer un rôle de chélateur [33]. Ces données suggèrent que les VE pourraient contrecarrer l'action délétère des peptides A β pathologiques contribuant une nouvelle fois à la plasticité synaptique.

La compréhension du rôle des VE dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives est donc primordiale. Ces VE pourraient en effet être la cible de traitements permettant de ralentir la progression des maladies, voire de restaurer les fonctions physiologiques. La présence de VE dans les liquides biologiques, tels que le LCS et le plasma, amène également à se questionner sur leur utilité comme biomarqueurs diagnostiques et pronostiques [34].

Neuroinflammation dans un contexte de démyélinisation

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du SN. Elle se caractérise par une démyélinisation des axones liée à un processus inflammatoire auquel participent des lymphocytes B anormalement présents dans le tissu cérébral. Contrairement à ce qui est observé chez un sujet sain, des VE produites par des lymphocytes B isolés de patients atteints de SEP sont capables d'induire la mort d'oligodendrocytes, affectant ainsi la formation de la gaine de myéline [35]. Physiologiquement, ces lymphocytes sont uniquement présents dans les vaisseaux sanguins, et, de par l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), ils ne peuvent pas être en contact direct avec les cellules du SN. Toutefois, une altération de la perméabilité de la BHE accompagne souvent la neuroinflammation. Les VE sécrétées par les cellules endothéliales de la BHE pourraient jouer un rôle dans le processus d'extravasation des lymphocytes B des vaisseaux sanguins vers le cerveau. Les VE produites par les lymphocytes B contiennent, notamment, la protéine claudine-1. C'est

elle qui va assurer la jonction entre les lymphocytes B circulants et les cellules endothéliales de la BHE [36]. Une fois les lymphocytes adhérents à l'endothélium, leur migration dans le tissu cérébral est permise par l'action de métalloprotéases et de la caspase-1, également sécrétées par les cellules endothéliales dans des VE. Ces enzymes induisent une dégradation de la matrice extracellulaire rendant la BHE perméable [37].

Les cellules microgliales sont définies comme les macrophages du cerveau engagés dans la réponse inflammatoire pour le défendre des infections et réparer les tissus. Elles libèrent des VE qui ressemblent à celles produites par les lymphocytes B et les cellules dendritiques en conditions basales. En effet, elles contiennent des facteurs de signalisation liés à la réponse immunitaire, comme des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), des protéines chaperones, des tétraspanines et des récepteurs membranaires. En contact avec des niveaux élevés d'ATP extracellulaire, libéré par des astrocytes ou des tissus lésés, les cellules microgliales sécrètent des VE contenant de l'IL(interleukine)-1 β , une cytokine pro-inflammatoire, qui va agir directement au niveau de la lésion et contribuer à la signalisation immunitaire [38]. Dans un modèle murin de SEP, il a été montré que la microglie est capable de provoquer une réponse inflammatoire aberrante [39] résultant, en partie, de l'internalisation des VE, et de leur cargo, par des neurones [40]. Ces travaux sont néanmoins controversés car une autre étude montre que l'injection de VE microgliales dans un modèle murin de SEP entraîne au contraire une amélioration de la motricité et, une réduction des infiltrats inflammatoires, de la démyélinisation et de la perte axonale [41]. Favorisant la migration et la maturation des cellules précurseurs d'oligodendrocytes, les VE microgliales participent cependant à la neuroprotection [42].

Infiltration et croissance tumorale

Les gliomes sont les cancers primitifs cérébraux les plus fréquents. Il en existe de nombreux types et sous-types. Leur pronostic dépend principalement du caractère limité ou infiltrant vis-à-vis du tissu cérébral. Dans la majorité des gliomes infiltrants, une infiltration tumorale dans les deux hémisphères cérébraux est observée au moment du diagnostic. Cela limite donc le traitement par résection chirurgicale complète puisque celui-ci n'est possible que pour les gliomes circonscrits. La capacité de migration des

cellules tumorales est étroitement liée à l'interaction que ces cellules ont avec le tissu qu'elles envahissent. En raison de leur capacité à moduler d'autres cellules, les VE ont été largement étudiées dans le contexte des tumeurs et de l'environnement tumoral. Dans les gliomes infiltrants, les interactions entre cellules tumorales et cellules du microenvironnement sont réciproques. Des VE issues de cellules gliales tumorales sont capables d'activer des astrocytes non tumoraux, provoquant des modifications de la matrice extracellulaire et facilitant ainsi l'invasion du tissu par le gliome [43–45]. La croissance tumorale est également très dépendante de la néo-angiogenèse. En conditions hypoxiques, les VE d'origine tumorale stimulent la néo-vascularisation en agissant sur les cellules endothéliales [46]. Une analyse par spectrométrie de masse des VE sécrétées par des cellules gliales tumorales a identifié plus de 1 000 protéines ayant des caractéristiques angiogéniques et invasives [47]. Le glioblastome, la tumeur la plus agressive du SN, libère des VE qui contiennent des micro-ARN, des ARNm, des histones et diverses protéines qui peuvent affecter la croissance tumorale [48]. Le transfert vésiculaire d'un micro-ARN spécifique, le miR-1238, d'une cellule cancéreuse à une autre, a également été impliqué dans la chimiorésistance [49]. À l'inverse, des VE microgliales, testées sur une culture de cellules isolées de gliome, sont capables d'inhiber l'invasion tumorale au cours du temps, soulignant cette fois-ci un rôle bénéfique des VE [50].

Conclusions

Nous avons dressé un aperçu de l'importance et de la diversité des échanges intercellulaires vésiculaires pour le fonctionnement normal du SN, bien que ce soit en conditions pathologiques que les VE ont été les plus étudiées. En effet, de par leur participation aux processus pathologiques, elles pourraient être utilisées pour le diagnostic des maladies cérébrales ou être la cible de thérapies innovantes. Toutefois, elles peuvent avoir un rôle aussi bien néfaste que bénéfique. Il est donc primordial d'identifier les sous-types vésiculaires impliquées dans la progression des maladies et ceux impliquées dans le maintien des fonctions physiologiques afin de développer des outils thérapeutiques ciblant uniquement les VE néfastes. Une autre approche consisterait à utiliser les VE non pas comme cible mais comme agent thérapeutique afin d'accroître leur rôle bénéfique.

Notons cependant que les données actuellement disponibles sont principalement obtenues à partir de cultures cellulaires *in vitro* qui ne sont pas forcément représentatives des mécanismes réels qui existent dans un système biologique complexe comme le cerveau. En effet, l'impact fonctionnel des VE au sein des réseaux cellulaires du cerveau reste difficile à établir compte tenu de la complexité des populations cellulaires impliquées dans la libération et l'internalisation des VE, ainsi que des limites techniques des approches actuelles d'analyse des VE. Ces données ouvrent cependant la voie à un champ d'étude très vaste pour mieux comprendre le fonctionnement cérébral global ainsi que pour développer de nouveaux outils thérapeutiques.

Summary

Extracellular Vesicles in the central nervous system

Extracellular Vesicles (EVs) are released by a wide diversity of cells. They contain proteins, RNAs and lipids that will be exchanged between these cells. They therefore represent a major form of intercellular communication in both physiological and pathological conditions. This is particularly relevant in the nervous system where neurons and glial cells form a very dense network where billions of connections are made. In this review, the different roles played by the EVs in a healthy brain to maintain cerebral homeostasis during development, synaptic transmission or axonal myelination will be discussed. In addition, the pathological aspect will also be addressed. Indeed, in recent years, the EVs have emerged as major players in the spread of neurodegenerative diseases, in neuroinflammation and in tumor development, although they may also be beneficial in some conditions.

Conflits d'intérêt

Aucun

Références

1. Sharma P, Mesci P, Carroneu C, *et al.* Exosomes regulate neurogenesis and circuit assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019 ; 116 : 16086–94.
2. Wang S, Cesca F, Loers G, *et al.* Synapsin I Is an Oligomannose-Carrying Glycoprotein, Acts As an Oligomannose-Binding Lectin, and Promotes Neurite

Outgrowth and Neuronal Survival When Released via Glia-Derived Exosomes. *J Neurosci* 2011 ; 31 : 7275–90.

3. Chaudhuri AD, Dasgheyb RM, DeVine LR, *et al.* Stimulus-dependent modifications in astrocyte-derived extracellular Vesicle cargo regulate neuronal excitability. *Glia* 2020 ; 68 : 128–44.

4. Lemaire Q, Raffo-Romero A, Arab T, *et al.* Isolation of microglia-derived extracellular Vesicles: towards miRNA signatures and neuroprotection. *J Nanobiotechnol* 2019 ; 17 : 119.

5. Chivet M, Javalet C, Laulagnier K, *et al.* Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J Extracell Vesicles* 2014 ; 3 : 24722.

6. Fauré J, Lachenal G, Court M, *et al.* Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 2006 ; 31 : 642–8.

7. Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, *et al.* Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 2011 ; 46 : 409–18.

8. Antonucci F, Turola E, Riganti L, *et al.* MicroVesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism: Microglial MVs increase sphingolipid metabolism in neurons. *EMBO J* 2012 ; 31 : 1231–40.

9. Gabrielli M, Battista N, Riganti L, *et al.* Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane Vesicles. *EMBO Rep* 2015 ; 16 : 213–20.

10. Holm MM, Kaiser J, Schwab ME. Extracellular Vesicles: Multimodal Envoys in Neural Maintenance and Repair. *Trends Neurosci* 2018 ; 41 : 360–72.

11. Korkut C, Li Y, Koles K, *et al.* Regulation of Postsynaptic Retrograde Signaling by Presynaptic Exosome Release. *Neuron* 2013 ; 77 : 1039–46.

12. Bahrini I, Song J, Diez D, *et al.* Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 7989.

13. Chivet M, Javalet C, Hemming F, *et al.* Exosomes as a novel way of interneuronal communication. *Biochem Soc Trans* 2013 ; 41 : 241–4.
14. Valadi H, Ekström K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007 ; 9 : 654–9.
15. Goldie BJ, Dun MD, Lin M, *et al.* Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. *Nucleic Acids Res* 2014 ; 42 : 9195–208.
16. Bakhti M, Winter C, Simons M. Inhibition of Myelin Membrane Sheath Formation by Oligodendrocyte-derived Exosome-like Vesicles. *J Biol Chemistry* 2011 ; 286 : 787–96.
17. Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, *et al.* Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte–Neuron Communication. *PLoS Biol* 2013 ; 11 : e1001604.
18. Krämer-Albers E-M, Bretz N, Tenzer S, *et al.* Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Prot Clin Appl* 2007 ; 1 : 1446–61.
19. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982 ; 216 : 136–44.
20. Fevrier B, Vilette D, Archer F, *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 9683–8.
21. Guo BB, Bellingham SA, Hill AF. Stimulating the Release of Exosomes Increases the Intercellular Transfer of Prions. *J Biol Chem* 2016 ; 291 : 5128–37.
22. Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, *et al.* Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 2007 ; 211 : 582–90.
23. Ma J, Gao J, Wang J, *et al.* Prion-Like Mechanisms in Parkinson’s Disease. *Fron. Neurosci* 2019 ; 13 : 552.

24. McAlary L, Plotkin SS, Yerbury JJ, *et al.* Prion-Like Propagation of Protein Misfolding and Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci* 2019 ; 12 : 262.
25. Colin M, Dujardin S, Schraen-Maschke S, *et al.* From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathol* 2020 ; 139 : 3–25.
26. Pérez M, Avila J, Hernández F. Propagation of Tau via Extracellular Vesicles. *Front Neurosci* 2019 ; 13 : 698.
27. Polanco JC, Scicluna BJ, Hill AF, *et al.* Extracellular vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner. *J Biol Chem* 2016 ; 291 : 12445–66.
28. Ruan Z, Pathak D, Venkatesan Kalavai S, *et al.* Alzheimer's disease brain-derived extracellular vesicles spread tau pathology in interneurons. *Brain* 2021 ; 144 : 288–309.
29. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, *et al.* Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 2015 ; 18 : 1584–93.
30. Sardar Sinha M, Ansell-Schultz A, Civitelli L, *et al.* Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol* 2018 ; 136 : 41–56.
31. Dinkins MB, Enasko J, Hernandez C, *et al.* Neutral Sphingomyelinase-2 Deficiency Ameliorates Alzheimer's Disease Pathology and Improve Cognition in the 5XFAD Mouse. *J Neurosci* 2016 ; 36 : 8653–67.
32. Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, *et al.* Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 10977–89.
33. An K, Klyubin I, Kim Y, *et al.* Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of A β assemblies in vivo. *Mol Brain* 2013 ; 6 : 47.
34. Gámez-Valero A, Beyer K, Borràs FE. Extracellular Vesicles, new actors in the search for biomarkers of dementias. *Neurobiol Aging* 2019 ; 74 : 15–20.

35. Benjamins JA, Nedelkoska L, Touil H, *et al.* Exosome-enriched fractions from MS B cells induce oligodendrocyte death. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2019 ; 6 : e550.
36. Paul D, Baena V, Ge S, *et al.* Appearance of claudin-5+ leukocytes in the central nervous system during neuroinflammation: a novel role for endothelial-derived extracellular Vesicles. *J Neuroinflammation* 2016 ; 13 : 292.
37. Sáenz-Cuesta M, Osorio-Querejeta I, Otaegui D. Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis: What are They Telling Us? *Front Cell Neurosci* 2014 ; 8 : 100.
38. Bianco F, Pravettoni E, Colombo A, *et al.* Astrocyte-Derived ATP Induces VEicle Shedding and IL-1 β Release from Microglia. *J Immunol* 2005 ; 174 : 7268–77.
39. Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, *et al.* Loss of ‘homeostatic’ microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain* 2017 ; 140 : 1900–13.
40. Prada I, Gabrielli M, Turola E, *et al.* Glia-to-neuron transfer of miRNAs via extracellular Vesicles: a new mechanism underlying inflammation-induced synaptic alterations. *Acta Neuropathol* 2018 ; 135 : 529–50.
41. Casella G, Colombo F, Finardi A, *et al.* Extracellular Vesicles Containing IL-4 Modulate Neuroinflammation in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Mol Ther* 2018 ; 26 : 2107–18.
42. Williams JL, Gatson NN, Smith KM, *et al.* Serum exosomes in pregnancy-associated immune modulation and neuroprotection during CNS autoimmunity. *Clin Immunol* 2013 ; 149 : 236–43.
43. D’Asti E, Garnier D, Lee TH, *et al.* Oncogenic extracellular Vesicles in brain tumor progression. *Front Physiol* 2012 ; 3 : 294.
44. Hallal S, Mallawaarachy DM, Wei H, *et al.* Extracellular Vesicles Released by Glioblastoma Cells Stimulate Normal Astrocytes to Acquire a Tumor-Supportive Phenotype Via p53 and MYC Signaling Pathways. *Mol Neurobiol* 2019 ; 56 : 4566–81.
45. Oushy S, Hellwinkel JE, Wang M, *et al.* Glioblastoma multiforme-derived extracellular Vesicles drive normal astrocytes towards a tumour-enhancing phenotype. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018 ; 373 : 20160477.

46. Tadokoro H, Umezu T, Ohyashiki K, *et al.* Exosomes Derived from Hypoxic Leukemia Cells Enhance Tube Formation in Endothelial Cells. *J Biol Chem* 2013 ; 288 : 34343–51.
47. Jaiswal R, Sedger LM. Intercellular VEicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Front Oncol* 2019 ; 9 : 125.
48. Skog J, Wurdinger T, Rijn S van, *et al.* Glioblastoma microVesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008 ; 10 : 1470–6.
49. Yin J, Zeng A, Zhang Z, *et al.* Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma. *EBioMedicine* 2019 ; 42 : 238–51.
50. Murgoci A-N, Cizkova D, Majerova P, *et al.* Brain-Cortex Microglia-Derived Exosomes: Nanoparticles for Glioma Therapy. *ChemPhysChem* 2018 ; 19 : 1205–14.

Légende de la figure

Figure 1. Les différents rôles des vésicules extracellulaires dans le système nerveux central. Le panel supérieur (fond vert) représente les conditions physiologiques, le panel inférieur (fond rouge) représente les conditions pathologiques. La diversité du contenu vésiculaire est illustrée dans la vésicule centrale. La couleur des VE dépend de leur origine cellulaire. BHE : barrière hémato-encéphalique ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; DNF : dégénérescence neurofibrillaire. (Réalisée avec BioRender.com)

